

明 細 書

標的指向性リポソームを含む炎症性疾患治療薬または診断薬

技術分野

本発明は、炎症性疾患に対するドラッグデリバリーシステムに関する。

背景技術

米国の国家ナノテク戦略（N N I）によって実現を目指す具体的目標の一例として、「癌細胞や標的組織を狙い撃ちする薬物や遺伝子送達システム（D D S：ドラッグデリバリーシステム）」を掲げた。日本の総合科学技術会議のナノテクノロジー・材料分野推進戦略でも、重点領域として「医療用極小システム・材料、生物のメカニズムを活用し制御するナノバイオロジー」があり、その5年間の研究開発目標の1つとして「健康寿命延伸のための生体機能材料・ピンポイント治療等技術の基本シーズ確立」が掲げられている。一方、高齢化社会となるに伴い癌の罹患率・死亡率は年々増えており、新規な治療材料である標的指向D D Sの開発が待望されている。その他の病気においても副作用のない標的指向D D Sナノ材料の重要性が注目されており、その市場規模は近い将来に10兆円を超えると予測されている。また、これらの材料は治療とともに診断への利用においても期待されている。

医薬品の治療効果は、薬物が特定の標的部位に到達し、そこで作用することにより発現される。その一方で、医薬品による副作用とは、薬物が不必要的部位に作用してしまうことである。従って、薬物を有効かつ安全に使用するためにドラッグデリバリーシステムの開発が求められている。その中でも特に標的指向（ターゲティング）D D Sとは、薬物を「体内の必要な部位に」、「必要な量を」、「必要な時間だけ」送り込むといった概念である。そのための代表的な材料としての微粒子性キャリアーであるリポソームが注目されている。この粒子に標的指向機能をもたせるために、リポソームの脂質の種類、組成比、粒子径、表面電荷を変化させるなどの受動的ターゲティング法が試みられているが、いまだ本法は不十

分であり更なる改良が求められている。

一方、高機能のターゲティングを可能にするために、能動的ターゲティング法も試みられている。これは”ミサイルドラッグ”ともよばれ理想的なターゲティング法であるが、国内外においてまだ完成されたものはなく今後の発展が大いに期待されているものである。本法は、リポソーム膜面上にリガンドを結合させ、標的組織の細胞膜面上に存在するレセプターに特異的に認識させることによって、積極的にターゲティングを可能にさせる方法である。この能動的ターゲティング法での標的となる細胞膜面上に存在するレセプターのリガンドとしては、抗原、抗体、ペプチド、糖脂質や糖蛋白質などが考えられる。これらのうち、糖脂質や糖蛋白質の糖鎖は、生体組織の発生や形態形成、細胞の増殖や分化、生体防御や受精機構、癌化とその転移機構などの様々な細胞間コミュニケーションにおいて情報分子としての重要な役割を果たしていることが明らかにされつつある。

また、その標的となる各組織の細胞膜面上に存在するレセプターとしてのセレクチン、DC-SIGN、DC-SGNR、コレクチン、マンノース結合レクチン等の C-タイプレクチン、シグレック等の I タイプレクチン、マンノース-6-リン酸受容体などの P タイプレクチン、R タイプレクチン、L タイプレクチン、M タイプレクチン、ガレクチンなどの各種のレクチン（糖鎖認識蛋白質）についての研究も進んできたことから、各種の分子構造を有する糖鎖は新しい DDS リガンドとして注目されてきている (1) Yamazaki, N., Kojima, S., Bovin, N.V., Andre, S., Gabius, S. and Gabius, H.-J. (2000) Adv. Drug Delivery Rev. 43, 225-244. 2) Yamazaki, N., Jigami, Y., Gabius, H.-J., Kojima, S (2001) Trends in Glycoscience and Glycotechnology 13, 319-329.

<http://www.gak.co.jp/TIGG/71PDF/yamazaki.pdf>).

外膜表面にリガンドを結合したリポソームについては、癌などの標的部位に選択的に薬物や遺伝子などを送達するための DDS 材料として多くの研究がなされてきた。しかしながら、それらは、生体外では標的細胞に結合するが、生体内では期待される標的細胞や組織にターゲティングされないものがほとんどである

- (1) Forssen, E. and Willis, M. (1998) Adv. Drug Delivery Rev. 29, 249-271.
2) 高橋俊雄・橋田充編 (1999)、今日の DDS ・ 薬物送達システム、159-167 頁、

医薬ジャーナル社、大阪)。糖鎖の分子認識機能を利用したDDS材料の研究開発においても、糖鎖を有する糖脂質を導入したリポソームについて若干の研究が知られているが、それらの機能評価は生体外 (in vitro) によるもののみであり、糖鎖を有する糖蛋白質を導入したリポソームの研究はほとんど進んでいない(1) DeFrees, S. A., Phillips, L., Guo, L. and Zalipsky, S. (1996) J. Am. Chem. Soc. 118, 6101-6104. 2) Spevak, W., Foxall, C., Charych, D. H., Dasgupta, F. and Nagy, J. O. (1996) J. Med. Chem. 39, 1018-1020. 3) Stahn, R., Schafer, H., Kernchen, F. and Schreiber, J. (1998) Glycobiology 8, 311-319. 4) Yamazaki, N., Jigami, Y., Gabius, H.-J., Kojima, S (2001) Trends in Glycoscience and Glycotechnology 13, 319-329.
<http://www.gak.co.jp/TIGG/71PDF/yamazaki.pdf>)。したがって、糖脂質や糖蛋白質の多種多様な糖鎖を結合したリポソームについての調製法と生体内動態 (in vivo) 解析を含めた体系的な研究は、これまで未開発で今後の進展が期待される重要な課題である。

さらに新しいタイプのDDS材料研究として、投与が最も簡便・安価に行える経口投与で使用可能なDDS材料開発も重要な課題である。たとえば、ペプチド性および蛋白質性医薬品などは一般的に水溶性で高分子量であり消化管の小腸粘膜透過性が低いため酵素分解を受けるなどにより経口投与してもほとんど腸管吸収されない。そこでこれらの高分子量の医薬品や遺伝子などを腸管から血液中へ送達するためのDDS材料としてリガンド結合リポソームの研究が注目されつつある (Lehr, C.-M. (2000) J. Controlled Release 65, 19-29)。しかしながら、これらのリガンドとして糖鎖を用いた腸管吸収制御性リポソームの研究は未だ報告されていない。

本発明者等は、既に、糖鎖がリンカー蛋白質を介してリポソーム膜に結合されており、糖鎖が、ルイスX型三糖鎖、シアリルルイスX型四糖鎖、3'-シアリルラクトサミン三糖鎖、6'-シアリルラクトサミン三糖鎖から選ばれたものであり、リポソーム膜および/またはリンカー蛋白質にトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン等の低分子親水化合物が任意に結合しており親水性化されていることを特徴とする糖鎖修飾リポソームおよびラクトース2糖鎖、2'-フコシルラクトー

ス三糖鎖、ジフコシルラクトース四糖類および3-フコシルラクトース三糖鎖から選ばれた糖鎖により修飾されたリポソームであって、糖鎖がリンカー蛋白質を介してリポソームに結合していてもよい、腸管吸収性リポソームについて特許出願を行っている。

しかし、炎症性疾患に対して治療用または診断用薬剤を標的指向的に投薬するドラッグデリバリーシステムは開発されていなかった。

炎症性疾患の中でも、リュウマチ性関節炎 (Rheumatoid Arthritis, RA) は関節炎を中心とした種々の先進症状を伴う自己免疫疾患であり、その患者の数は日本で70万人程度と言われている。この患者数は自己免疫疾患中で最大であり、RAの治療改善は社会的に大きな貢献をもたらすことになると思われる。

RAの発症には遺伝的要因（特定のHLAなど）や環境要因（virusの感染など）が関与していると考えられているが、詳細な発症機序は不明である。しかし炎症部位には関節のシノビュウムに存在するマクロファージとCD4+, CD8+, T細胞の存在が確認されており、このT細胞がシノビュウムに存在する抗原を認識していることがわかっている (T. Toyosaki, et al. 1998 *Arthritis Rheum.* 41, 92-100, P. L. van Lent, et al. 1996 *Arthritis Rheum.* 39, 1545-1555)。そしてこれら炎症に起因する細胞にはIL-1、tumor necrotic factor-alpha (以下TNF-a) そしてIL-6などのいわゆる炎症性サイトカインが深く関与していることが示唆されている (S. Saijo, et al. 2002 *Arthritis Rheum.* 46, 533-544. D. Kontoyiannis, et al. 1999 *Immunity* 10, 387-398. T. Ohtani, et al. 2000 *Immunity* 12, 95-105.)。

近年RAの治療はこれらの新しい知見をもとに大きく変わり始め、最大の進歩は生物学的製剤が開発されたことである。つまりTNF-alpha (以下TNF-a)に対する種々の抗体治療薬の出現である。これら抗体治療薬は関節炎に対して高い治療効果を有し、関節組織破壊抑制効果もある等、従来の治療薬とは一線を画する新薬である。しかしこれら新薬は一方において、感染症をはじめとする重篤な有害事象を起こしうることが報告されている。この副作用の原因の一つとしては関節という局所の炎症をコントロールするために、非特異的に全身に大量の抗TNF-a抗体が投与されることに起因していると考えられる。

従来から使用されている薬剤も含め、革新的新薬といえども副作用を有する治療薬は病巣部位に特異的に分配され、病巣部位のみで有効性を発揮することが理想的である。このようなシステムは薬剤の副作用を減らし、かつ薬効をさらに引き上げることが可能で、現在最新薬剤として注目されている生物製剤や、分子標的薬の開発と同様に重要と考えられる。

発明の開示

炎症性疾患部位等の標的組織に集積し、局所的に薬剤や遺伝子を患部に送り込むための治療または診断用のドラッグデリバリーシステム (DDS) として利用できる標的指向性 DDS ナノ粒子の提供。具体的には、炎症部位の血管内皮細胞に発現する E-セレクチン、P-セレクチン等と結合しうる糖鎖を表面に結合させたドラッグデリバリー用の標的指向性リポソームの提供。

本発明者らは、先に表面に特定の糖鎖が結合した DDS 用標的指向性リポソームを開発した。該標的指向性リポソームには、シアリルルイス X 糖鎖 (sLeX) が結合しており、腫瘍部位、炎症部位への移行性において高い効率を有していた。

本発明者らは、この標的指向性リポソームの炎症性疾患領域への応用について鋭意検討を行い、炎症性疾患モデル動物として、眼炎症モデルマウスを作出し、上記標的指向性リポソームが眼の炎症部位に指向的に取り込まれることを見出し本発明を完成させるに至った。

今回開発された Drug Delivery System (以下 DDS) は炎症部位へ特異的に集積し、効率的で副作用の少ない治療システムを可能にするものである。ステロイド剤は抗炎症薬としては最も一般的なため、これが実施例に用いられたが、治療薬はこれに限らず免疫抑制剤、サイトカイン、抗サイトカイン剤、DNA および RNA を含む核酸などの分配が可能である。

すなわち、本発明は以下の通りである。

1. 糖鎖がリポソーム膜に結合されている糖鎖修飾リポソームを含む炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

2. リポソームの構成脂質が、フォスファチジルコリン類(モル比 0 ~ 70%)、フォスファチジルエタノールアミン類(モル比 0 ~ 30%)、フォスファチジン酸類、

長鎖アルキルリン酸塩類およびジセチルリン酸類からなる群から選択される 1 種以上の脂質（モル比 0～30%）、ガングリオシド類、糖脂質類、フォスファチジルグリセロール類およびスフィンゴミエリン類からなる群から選択される 1 種以上の脂質（モル比 0～40%）、ならびにコレステロール類（モル比 0～70%）を含む、1 記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

3. ガングリオシド類、糖脂質類、フォスファチジルグリセロール類、スフィンゴミエリン類およびコレステロール類からなる群から選択される少なくとも 1 種の脂質がリポソーム表面上で集合しラフトを形成している 2 記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

4. 糖鎖の種類および密度が制御されて結合されている、1 から 3 のいずれかに記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

5. リポソームの粒径が 30～500nm である、1 から 4 のいずれかに記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

6. リポソームの粒径が 50～300nm である、5 記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

7. リポソームのゼータ電位が-50～10mV である、1 から 6 のいずれか 1 項記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

8. リポソームのゼータ電位が-40～0mV である、7 記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

9. リポソームのゼータ電位が-30～-10mV である、8 記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

10. 糖鎖がリンカー蛋白質を介してリポソーム膜に結合されている、1 から 9 のいずれかに記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

11. リンカー蛋白質が生体由来蛋白質である 10 記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

12. リンカー蛋白質がヒト由来蛋白質である 11 記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

13. リンカー蛋白質がヒト由来血清蛋白質である 12 記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

14. リンカー蛋白質がヒト血清アルブミンまたはウシ血清アルブミンである10記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

15. リンカー蛋白質がリポソーム表面上に形成されているガングリオシド類、糖脂質類、フォスファチジルグリセロール類、スフィンゴミエリン類およびコレステロール類からなる群から選択される少なくとも1種の脂質からなるラフト上に結合している1から14のいずれかに記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

16. リポソーム膜および／またはリンカー蛋白質に親水性化合物が結合することにより親水性化されている、1から15のいずれかに記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

17. 親水性化合物が低分子物質である、16記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

18. 親水性化合物が糖鎖に対する立体障害となりにくく標的細胞膜面上のレクチンによる糖鎖分子認識反応の進行を妨げない、16または17記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

19. 親水性化合物が水酸基を有する16から18のいずれかに記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

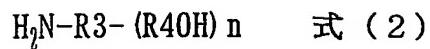
20. 親水性化合物がアミノアルコール類である16から19のいずれかに記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

21. 親水性化合物がリポソーム膜表面に直接結合している16から20のいずれかに記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

22. 親水性化合物により親水性化され、該親水性化合物が、一般式(1)
X-R1(R2OH)_n 式(1)

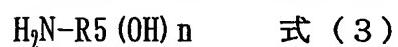
で示される16記載の糖鎖修飾リポソームであって、R1は、C1からC40の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、R2は存在しないかもしくはC1からC40の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、Xはリポソーム脂質またはリンカー蛋白質と直接または架橋用の二価試薬と結合する反応性官能基を示し、nは自然数を示す、炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

23. 親水性化合物により親水性化され、該親水性化合物が、一般式(2)



で示される 16 記載の糖鎖修飾リポソームであって、R3 は、C1 から C40 の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、R4 は存在しないかもしくは C1 から C40 の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、H₂N はリポソーム脂質またはリンカー蛋白質と直接または架橋用の二価試薬と結合する反応性官能基を示し、n は自然数を示す、炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

24. 親水性化合物により親水性化され、該親水性化合物が、一般式 (3)



で示される 16 記載の糖鎖修飾リポソームであって、R5 は、C1 から C40 の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、H₂N はリポソーム脂質またはリンカー蛋白質と直接または架橋用の二価試薬と結合する反応性官能基を示し、n は自然数を示す、炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

25. リポソーム膜および／またはリンカー蛋白質にトリス(ヒドロキシアルキル)アミノアルカンである親水性化合物を共有結合により結合させることによりリポソーム膜および／またはリンカー蛋白質が親水性化されている、16 記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

26. リポソーム膜および／またはリンカー蛋白質にトリス(ヒドロキシメチル)アミノエタン、トリス(ヒドロキシエチル)アミノエタン、トリス(ヒドロキシプロピル)アミノエタン、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン、トリス(ヒドロキシエチル)アミノメタン、トリス(ヒドロキシプロピル)アミノメタン、トリス(ヒドロキシメチル)アミノプロパン、トリス(ヒドロキシエチル)アミノプロパン、トリス(ヒドロキシプロピル)アミノプロパンからなる群から選択される親水性化合物を共有結合により結合させることによりリポソーム膜および／またはリンカー蛋白質が親水性化されている、16 記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

27. 糖鎖修飾リポソームが、各組織の細胞膜面上に存在するレセプターとしてのセレクチン、DC-SIGN、DC-SGNR、コレクチンおよびマンノース結合レクチンを含む C-タイプレクチン、シグレックを含む I タイプレクチン、マンノース-6-リン酸受容体を含む P タイプレクチン、R タイプレクチン、L タイプレクチン、M

タイプレクチン、ガレクチンからなる群から選択されるレクチンを標的とする 1 から 26 のいずれかに記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

28. 糖鎖修飾リポソームが E-セレクチン、P-セレクチンおよび L-セレクチンからなる群から選択されるセレクチンを標的とする 27 記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

29. リポソームに結合した糖鎖の結合密度が、リポソームに結合させるリンカ一蛋白質 1 分子当り 1 ~ 60 個である、1 から 28 のいずれかに記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

30. リポソームに結合した糖鎖の結合密度が、リンカ一蛋白質を用いる場合は、リポソーム 1 粒子当り 1 ~ 30000 個であり、リンカ一蛋白質を用いない場合は、リポソーム 1 粒子当り最高 1 ~ 500000 個である、1 から 28 のいずれかに記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

31. 糖鎖がルイス X 型三糖鎖、シアリルルイス X 型四糖鎖、3'-シアリルラクトサミン三糖鎖、6'-シアリルラクトサミン三糖鎖、アルファ 1,2 マンノビオース二糖鎖、アルファ 1,3 マンノビオース二糖鎖、アルファ 1,4 マンノビオース二糖鎖、アルファ 1,6 マンノビオース二糖鎖、アルファ 1,3 アルファ 1,6 マンノトリオース三糖鎖、オリゴマンノース 3 五糖鎖、オリゴマンノース 4 b 六糖鎖、オリゴマンノース 5 七糖鎖、オリゴマンノース 6 八糖鎖、オリゴマンノース 7 九糖鎖、オリゴマンノース 8 十糖鎖、オリゴマンノース 9 十一糖鎖、ラクトース二糖鎖、2'-フコシルラクトース三糖鎖、ジフコシルラクトース四糖類、3-フコシルラクトース三糖鎖、3'-シアリルラクトース三糖鎖および 6'-シアリルラクトース三糖鎖からなる群から選択される、1 から 30 のいずれかに記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

32. 糖鎖修飾リポソームが含む薬剤が、副腎皮質ホルモン、抗炎症薬、免疫抑制剤、抗がん剤、抗菌薬、抗ウイルス薬、血管新生抑制剤、サイトカインやケモカイン、抗サイトカイン抗体や抗ケモカイン抗体、抗サイトカイン・ケモカイン受容体抗体、siRNA や DNA などの遺伝子治療関連の核酸製剤、神経保護因子および抗体医薬からなる群から選択される 1 から 31 のいずれかに記載の炎症性疾患治療用医薬組成物。

3 3 . 糖鎖修飾リポソームが含む薬剤が、副腎皮質ホルモンまたは抗炎症薬である 3 2 記載の炎症性疾患治療用医薬組成物。

3 4 . 糖鎖修飾リポソームが含む薬剤がプレドニゾロンである 3 3 記載の炎症性疾患治療用医薬組成物。

3 5 . 薬剤が、薬剤を単独投与した場合に比べ、炎症部位に 10 倍以上多く集積し得る、3 2 から 3 4 のいずれかに記載の炎症性疾患治療用医薬組成物。

3 6 . 炎症性疾患が脳炎、炎症性眼疾患、耳炎、咽頭炎、肺炎、胃炎、腸炎、肝炎、脾炎、腎炎、膀胱炎、尿道炎、子宮体炎、膿炎、関節炎、末梢神経炎、悪性腫瘍、感染性疾患、リウマチ、全身性エリテマトーデス、サルコイドーシスなどの自己免疫疾患、心筋梗塞、脳梗塞などの虚血性疾患、糖尿病、痛風などの代謝性疾患、外傷・熱傷・化学腐食、アルツハイマー病などの神経変性疾患からなる群から選択される、1 から 3 5 のいずれかに記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

3 7 . 炎症性疾患が炎症性眼疾患である 3 6 記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

3 8 . 炎症性疾患がリウマチである 3 6 記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

3 9 . 炎症性疾患が腸炎である 3 6 記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

4 0 . 経口投与用医薬組成物である、1 から 3 9 のいずれかに記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

4 1 . 非経口投与用医薬組成物である、1 から 3 9 のいずれかに記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

4 2 . リポソーム膜が親水性化されており、表面に糖鎖が結合していないリポソームを含む炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

4 3 . リポソームの構成脂質が、フォスファチジルコリン類(モル比 0 ~ 70%)、フォスファチジルエタノールアミン類(モル比 0 ~ 30%)、フォスファチジン酸類、長鎖アルキルリン酸塩類およびジセチルリン酸類からなる群から選択される 1 種以上の脂質(モル比 0 ~ 30%)、ガングリオシド類、糖脂質類、フォスファチジル

グリセロール類およびスフィンゴミエリン類からなる群から選択される1種以上の脂質(モル比0～40%)、ならびにコレステロール類(モル比0～70%)を含む、42記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

44. リポソームが、さらに蛋白質を含む43記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

45. リポソーム膜および/またはリンカー蛋白質に親水性化合物が結合することにより親水性化されている、42から44のいずれかに記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

46. 親水性化合物が低分子物質である、45記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

47. 親水性化合物が水酸基を有する45または46に記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

48. 親水性化合物がアミノアルコール類である45から47のいずれかに記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

49. 親水性化合物がリポソーム膜表面に直接結合している45から48のいずれかに記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

50. 親水性化合物により親水性化され、該親水性化合物が、一般式(1)
X-R1(R2OH)_n 式(1)

で示される45記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物であって、R1は、C1からC40の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、R2は存在しないかもしくはC1からC40の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、Xはリポソーム脂質またはリンカー蛋白質と直接または架橋用の二価試薬と結合する反応性官能基を示し、nは自然数を示す、炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

51. 親水性化合物により親水性化され、該親水性化合物が、一般式(2)
H₂N-R3-(R4OH)_n 式(2)

で示される45記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物であって、R3は、C1からC40の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、R4は存在しないかもしくはC1からC40の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、H₂Nはリポソーム脂質またはリンカー蛋白質と直接または架橋用の二価試薬と結合する反応性官能基を示し、

nは自然数を示す、炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

52. 親水性化合物により親水性化され、該親水性化合物が、一般式（3）

$$\text{H}_2\text{N}-\text{R}_5(\text{OH})^n \quad \text{式(3)}$$

で示される45記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物であって、R5は、C1からC40の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、H₂Nはリポソーム脂質またはリンカーホテインと直接または架橋用の二価試薬と結合する反応性官能基を示し、nは自然数を示す、炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

53. リポソーム膜および／またはリンカーホテインにトリス（ヒドロキシアルキル）アミノアルカンである親水性化合物を共有結合により結合させることによりリポソーム膜および／またはリンカーホテインが親水性化されている、45記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

54. リポソーム膜および／またはリンカーホテインにトリス（ヒドロキシメチル）アミノエタン、トリス（ヒドロキシエチル）アミノエタン、トリス（ヒドロキシプロピル）アミノエタン、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン、トリス（ヒドロキシエチル）アミノメタン、トリス（ヒドロキシプロピル）アミノメタン、トリス（ヒドロキシメチル）アミノプロパン、トリス（ヒドロキシエチル）アミノプロパン、トリス（ヒドロキシプロピル）アミノプロパンからなる群から選択される親水性化合物を共有結合により結合させることによりリポソーム膜および／またはリンカーホテインが親水性化されている、53記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

55. リポソームが含む薬剤が、副腎皮質ホルモン、抗炎症薬、免疫抑制剤、抗がん剤、抗菌薬、抗ウイルス薬、血管新生抑制剤、サイトカインやケモカイン、抗サイトカイン抗体や抗ケモカイン抗体、抗サイトカイン・ケモカイン受容体抗体、siRNAやDNAなどの遺伝子治療関連の核酸製剤、神経保護因子および抗体医薬からなる群から選択される42から54のいずれかに記載の炎症性疾患治療用医薬組成物。

56. リポソームが含む薬剤が、副腎皮質ホルモンまたは抗炎症薬である5記載の炎症性疾患治療用医薬組成物。

57. リポソームが含む薬剤がプレドニゾロンである56記載の炎症性疾患

治療用医薬組成物。

58. 薬剤が、薬剤を単独投与した場合に比べ、炎症部位に10倍以上多く集積し得る、55から57のいずれかに記載の炎症性疾患治療用医薬組成物。

59. 炎症性疾患が脳炎、炎症性眼疾患、耳炎、咽頭炎、肺炎、胃炎、腸炎、肝炎、脾炎、腎炎、膀胱炎、尿道炎、子宮体炎、膿炎、関節炎、末梢神経炎、悪性腫瘍、感染性疾患、リウマチ、全身性エリテマトーデス、サルコイドーシスなどの自己免疫疾患、心筋梗塞、脳梗塞などの虚血性疾患、糖尿病、痛風などの代謝性疾患、外傷・熱傷・化学腐食、アルツハイマー病などの神経変性疾患からなる群から選択される、42から58のいずれかに記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

60. 炎症性疾患が炎症性眼疾患である59記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

61. 炎症性疾患がリウマチである59記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

62. 炎症性疾患が腸炎である59記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

63. 経口投与用医薬組成物である、42から62のいずれかに記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

63. 非経口投与用医薬組成物である、42から62のいずれかに記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願 2003-285422、2003-369494号の明細書および/または図面に記載される内容を包含する。

図面の簡単な説明

図1は、ルイスX型三糖鎖を結合したリポソームの構造例を示す模式図である。

図2は、シアリルルイスX型四糖鎖を結合したリポソームの構造例を示す模式図である。

図3は、3'-シアリルラクトサミン三糖鎖を結合したリポソームの構造例を示す模式図である。

図4は、6'-シアリルラクトサミン三糖鎖を結合したリポソームの構造例を示す模式図である。

図5は、アルファ1,2マンノピオース二糖鎖を結合したリポソームの構造例を示す模式図である。

図6は、アルファ1,3マンノピオース二糖鎖を結合したリポソームの構造例を示す模式図である。

図7は、アルファ1,4マンノピオース二糖鎖を結合したリポソームの構造例を示す模式図である。

図8は、アルファ1,6マンノピオース二糖鎖を結合したリポソームの構造例を示す模式図である。

図9は、アルファ1,3アルファ1,6マンノトリオース三糖鎖を結合したリポソームの構造例を示す模式図である。

図10は、オリゴマンノース3五糖鎖を結合したリポソームの構造例を示す模式図である。

図11は、オリゴマンノース4b六糖鎖を結合したリポソームの構造例を示す模式図である。

図12は、オリゴマンノース5七糖鎖を結合したリポソームの構造例を示す模式図である。

図13は、オリゴマンノース6八糖鎖を結合したリポソームの構造例を示す模式図である。

図14は、オリゴマンノース7九糖鎖を結合したリポソームの構造例を示す模式図である。

図15は、オリゴマンノース8十糖鎖を結合したリポソームの構造例を示す模式図である。

図16は、オリゴマンノース9十一糖を結合したリポソームの構造例を示す模式図である。

図17は、ラクトース二糖鎖により修飾されたリポソームの構造例を示す模式図である。

図18は、2'-フコシルラクトース三糖鎖により修飾されたリポソームの構造

例を示す模式図である。

図19は、ジフコシルラクトース四糖鎖により修飾されたリポソームの構造例を示す模式図である。

図20は、3-フコシルラクトース三糖鎖により修飾されたリポソームの構造例を示す模式図である。

図21は、3'-シアリルラクトース三糖鎖を結合したリポソームの構造例を示す模式図である。

図22は、6'-シアリルラクトース三糖鎖を結合したリポソームの構造例を示す模式図である。

図23は、比較試料としての tris(hydroxymethyl) aminomethane を結合したリポソームの模式図である。

図24は、実験的ぶどう膜炎発症を示す写真である。

図25Aは、リポソームの臓器別分布を示す図である。

図25Bは、リポソームの臓器別分布を示す図であり、正常マウスに対する相対値%で示した図である。

図26は、リポソーム分布の時間経過を示す写真である。

図27は、正常マウスおよびEAUマウスでのリポソーム分布を示す写真である。

図28は、蛍光抗体法による検出の結果を示す写真である。

図29は、酵素抗体法による検出の結果を示す写真である。

図30は、結合阻害実験の結果を示す写真である。

図31は、炎症を起こしたRAマウスの四肢の写真である。

図32は、RAマウスに対するプレドニゾロン包埋 DDS 静脈投与による治療の結果を示す図である。

図33は、RAマウスに対するプレドニゾロン包埋 DDS 経口投与による治療の結果を示す図である。

図34は、RAマウスに対する適切量のプレドニゾロン投与による治療の結果を示す図である。

図35は、2種類の親水性化処理を行ったリポソームと未処理のリポソームの担癌マウス尾静注投与5分後の血中滞留性の比較結果を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明は、炎症性疾患の病巣部位に標的指向性を有し、病巣部位に特異的に取り込まれ、病巣部位で封入された薬剤を放出し、病巣を治療しうる標的指向性リポソームである。

炎症時に血管内皮細胞に発現するE-セレクチン、P-セレクチンと白血球の細胞膜上に発現している糖鎖であるシアリルルイスXが強く結合することが知られている。本リポソームはこのシアリルルイスX糖鎖またはこれと同様にE-セレクチン、P-セレクチン等に反応することができる糖鎖が糖鎖の種類と密度が制御されて結合しているリポソームであり、血管内皮細胞がE-セレクチン、P-セレクチン等を発現している病巣部位に特異的に集積すると考えられる。またE-セレクチン、P-セレクチン等を発現している部位は炎症や血管新生が生じている部位であり、そのような部位の血管は内皮細胞の細胞間隙が拡大しており、集積したリポソームがその隙間から病巣部位およびその周囲に拡散するものと考えられる。拡散したリポソームは病巣部位およびその周囲の各種細胞に取り込まれ(phagocytosis)、細胞内で内包している薬剤を放出する。このようなメカニズムで炎症性疾患に効果を発揮する。

本発明のリポソームに結合させる糖鎖として、上述のようにE-セレクチン、P-セレクチン等に反応することができる糖鎖が挙げられる。ここで、E-セレクチン、P-セレクチン等とは、セレクチン、DC-SIGN、DC-SGNR、コレクチン、マンノース結合レクチン等のC-タイプレクチン、シグレック等のIタイプレクチン、マンノース-6-リン酸受容体などのPタイプレクチン、Rタイプレクチン、Lタイプレクチン、Mタイプレクチン、ガレクチンなどの各種のレクチン(糖鎖認識蛋白質)をいう。このような糖鎖は限定されないが、例えば、ルイスX型三糖鎖(構造式を図1に示す。以下、同様)、シアリルルイスX型四糖鎖(図2)、3'-シアリルラクトサミン三糖鎖(図3)、6'-シアリルラクトサミン三糖鎖(図4)、アルファ1,2マンノピオース二糖鎖(図5)、アルファ1,3マンノピオース二糖鎖(図6)、アルファ1,4マンノピオース二糖鎖(図7)、アルファ1,6マンノピオース二糖鎖(図8)、アルファ1,3アルファ1,6マンノトリオース三糖鎖(図9)、オリゴマ

ンノース3五糖鎖（図10）、オリゴマンノース4b六糖鎖（図11）、オリゴマンノース5七糖鎖（図12）、オリゴマンノース6八糖鎖（図13）、オリゴマンノース7九糖鎖（図14）、オリゴマンノース8十糖鎖（図15）、オリゴマンノース9十一糖鎖（図16）、ラクトース二糖鎖（図17）、2'-フコシルラクトース三糖鎖（図18）、ジフコシルラクトース四糖類（図19）、3-フコシルラクトース三糖鎖（図20）、3'-シアリルラクトース三糖鎖（図21）および6'-シアリルラクトース三糖鎖（図22）が挙げられる。

（1）標的指向性リポソームの作製

リポソームとは、通常、膜状に集合した脂質層および内部の水層から構成される閉鎖小胞を意味する。本発明のリポソームは、図1～22に示されるように、その表面すなわち脂質層に糖鎖が、結合している。糖鎖は直接リポソームの脂質層に結合していてもよいし、ヒト血清アルブミンのようなリンカー蛋白質を介して、共有結合していてもよい。

本発明のリポソームを構成する脂質としては、例えば、フォスファチジルコリン類、フォスファチジルエタノールアミン類、フォスファチジン酸類もしくは長鎖アルキルリン酸塩類、ガングリオシド類、糖脂質類もしくはフォスファチジルグリセロール類、コレステロール類等が挙げられ、フォスファチジルコリン類としては、ジミリストイルフォスファチジルコリン、ジパルミトイルフォスファチジルコリン、ジステアロイルフォスファチジルコリン等が、また、フォスファチジルエタノールアミン類としては、ジミリストイルフォスファチジルエタノールアミン、ジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミン、ジステアロイルフォスファチジルエタノールアミン等が、フォスファチジン酸類もしくは長鎖アルキルリン酸塩類としては、ジミリストイルフォスファチジン酸、ジパルミトイルフォスファチジン酸、ジステアロイルフォスファチジン酸、ジセチルリン酸等が、ガングリオシド類としては、ガングリオシドGM1、ガングリオシドGD1a、ガングリオシドGT1b等が、糖脂質類としては、ガラクトシルセラミド、グルコシルセラミド、ラクトシルセラミド、フォスファチド、グロボシド等が、フォスファチジルグリセロール類としては、ジミリストイルフォスファチジルグリセロール、ジパルミトイルフォスファチジルグリセロール、ジステアロイルフォスフ

アチジルグリセロール等が好ましい。このうち、fosfatidylcholine類もしくは長鎖アルキルリン酸塩類、ganglioside類もしくは糖脂質類、コレステロール類はリポソームの安定性を上昇させる効果を有するので、構成脂質として添加するのが望ましい。

例えば、本発明のリポソームを構成する脂質として、fosfatidylcholine類(モル比0～70%)、fosfatidylethanolamine類(モル比0～30%)、fosfatidylcholine類もしくは長鎖アルキルリン酸塩(モル比0～30%)、ganglioside類、糖脂質類もしくはfosfatidylglycerol類(モル比0～40%)、およびコレステロール類(モル比0～70%)を含むものが挙げられる。

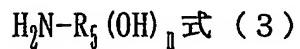
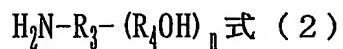
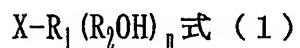
リポソーム自体は、周知の方法に従い製造することができるが、これには、薄膜法、逆層蒸発法、エタノール注入法、脱水一再水和法等を挙げることができる。

また、超音波照射法、エクストルージョン法、フレンチプレス法、ホモジナイゼーション法等を用いて、リポソームの粒子径を調節することも可能である。本発明のリポソーム自体の製法について、具体的に述べると、例えば、まず、fosfatidylcholine類、コレステロール、fosfatidylethanolamine類、fosfatidylcholine類、ganglioside類、糖脂質類もしくはfosfatidylglycerol類を配合成分とする脂質と界面活性剤コール酸ナトリウムとの混合ミセルを調製する。

とりわけ、fosfatidylethanolamine類の配合は親水性化反応部位として、ganglioside類または糖脂質類またはfosfatidylglycerol類の配合はリンカー蛋白質の結合部位として必須のものである。そして、これにより得られる混合ミセルの限外濾過を行うことによりリポソームを作製する。

本発明において使用するリポソームは、通常のものでも使用できるが、その表面は親水性化されていることが望ましい。上述のようにしてリポソームを作製した後にリポソーム表面を親水性化する。リポソーム表面の親水性化は、リポソーム表面に親水性化合物を結合させることにより行う。親水性化に用いる化合物としては、低分子の親水性化合物、好ましくは少なくとも1つのOH基を有する低分子の親水性化合物、さらに好ましくは、少なくとも2つのOH基を有する低分子の親水性化合物が挙げられる。また、さらに少なくとも1つのアミノ基を有する低

分子の親水性化合物、すなわち分子中に少なくとも1つのOH基と少なくとも1つのアミノ基を有する親水性化合物が挙げられる。親水性化合物は、低分子なので、糖鎖に対する立体障害となりにくく標的細胞膜面上のレクチンによる糖鎖分子認識反応の進行を妨げることはない。また、親水性化合物には、本発明の糖鎖修飾リポソームにおいて、レクチン等の特定の標的を指向するために用いられるレクチンが結合し得る糖鎖は含まれない。このような親水性化合物として、例えば、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンなどを含むトリス(ヒドロキシアルキル)アミノアルカン等のアミノアルコール類等が挙げられ、さらに具体的には、トリス(ヒドロキシメチル)アミノエタン、トリス(ヒドロキシエチル)アミノエタン、トリス(ヒドロキシプロピル)アミノエタン、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン、トリス(ヒドロキシプロピル)アミノメタン、トリス(ヒドロキシエチル)アミノメタン、トリス(ヒドロキシメチル)アミノプロパン、トリス(ヒドロキシエチル)アミノプロパン、トリス(ヒドロキシプロピル)アミノプロパン等が挙げられる。さらに、OH基を有する低分子化合物にアミノ基を導入した化合物も本発明の親水性化合物として用いることができる。該化合物は限定されないが、例えば、セロビオース等のレクチンが結合しない糖鎖にアミノ基を導入した化合物が挙げられる。例えば、リポソーム膜の脂質フォスファチジルエタノールアミン上に架橋用の2価試薬とトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンとを用いてリポソーム表面を親水性化する。親水性化合物の一般式は、下記式(1)、式(2)、式(3)等で示される。



ここで、R1、R3およびR5は、C1からC40、好ましくはC1からC20、さらに好ましくはC1からC10の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、R2、R4は存在しないかもしくはC1からC40、好ましくはC1からC20、さらに好ましくはC1からC10の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示す。Xはリポソーム脂質と直接または架橋用の二価試薬と結合する反応性官能基を示し、例えば、COOH、NH、NH₂、CHO、SH、NHS-エステル、マレイミド、イミドエステル、活性ハロゲン、EDC、ピリジル

ジスルフィド、アジドフェニル、ヒドラジド等が挙げられる。nは自然数を示す。

リポソームの親水性化は、従来公知の方法、例えば、ポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、無水マレイン酸共重合体等を共有結合により結合させたリン脂質を用いてリポソームを作成する方法（特開2000-302685号）等の方法を採用することによっても行うことができる。

このうち、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンを用いてリポソーム表面を親水性化することが特に好ましい。

本発明のトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン等の低分子親水性化合物を用いる手法は、ポリエチレングリコールなどを用いる従来の親水性化方法と比較していくつかの点で好ましい。例えば、本発明のように糖鎖をリポソーム上に結合してその分子認識機能を標的指向性に利用するものでは、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン等の低分子親水化合物は低分子量物質であるので従来のポリエチレングリコールなどの高分子量物質を用いる方法に比べて、糖鎖に対する立体障害となりにくく標的細胞膜面上のレクチン（糖鎖認識蛋白質）による糖鎖分子認識反応の進行を妨げないので特に好ましい。

また、本発明によるリポソームは該親水性化処理後においても粒径分布や成分組成、分散特性が良好であり、長時間の保存性や生体内安定性も優れているのでリポソーム製剤化して利用するために好ましい。

トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン等の低分子親水性化合物を用いてリポソーム表面を親水性化するには、例えばジミリストイルフォスファチジルエタノールアミン、ジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミン、ジステアロイルフォスファチジルエタノールアミン等の脂質を用いて、常法により得たりポソーム溶液にビススルフォスクシニミデルスベラート、ジスクシニミデルグルタレート、ジチオビススクシニミデルプロピオネート、ジスクシニミデルスベラート、3,3'-ジチオビススルフォスクシニミデルプロピオネート、エチレングリコールビススクシニミデルスクシネート、エチレングリコールビススルフォスクシニミデルスクシネート等の2価試薬を加えて反応させることにより、リポソーム膜上のジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミン等の脂質に2価試薬を結合させ、次いでトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンを、該2価試薬の一方

の結合手と反応させることにより、リポソーム表面にトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンを結合せしめる。

リポソーム表面に親水性化合物を結合させる場合、リポソーム1粒子当たり1～500000分子、好ましくは1～50000分子である。

このように、リポソームを親水性化処理したリポソームは、生体内で極めて安定であり、後述のように標的指向性を有する糖鎖を結合しなくとも、生体内での半減期が長いためドラッグデリバリーシステムにおけるドラッグ担体として好適に用いることができる。本発明は、表面を低分子化合物で親水性化したリポソームをも包含する。

本発明は、上記の親水性化化合物を用いて親水性化した糖鎖の結合していないリポソームそのものをも包含する。このような親水性化したリポソームは、リポソーム自体の安定性が高まり、また糖鎖を結合したときに糖鎖の認識性が高まるという利点がある。

本発明においては、上記のようにして作製したリポソームに、上記の糖鎖のいずれかを直接結合させてもよいし、さらに、糖鎖をリンカー蛋白質を介して結合させてもよい。この際、リポソームに結合させる糖鎖の種類は1種類に限らず、複数の糖鎖を結合させてもよい。この場合の複数の糖鎖は同じ組織または器官の細胞表面に共通して存在する異なるレクチンに対して結合活性を有する複数の糖鎖であってもよいし、異なる組織または器官の細胞表面に存在する異なるレクチンに対して結合活性を有する糖鎖であってもよい。前者のような複数の糖鎖を選択することにより、特定の標的組織または器官を確実に指向することができ、後者のような複数の糖鎖を選択することにより、1種類のリポソームに複数の標的を指向させることができ、マルチパーパスな標的指向性リポソームを得ることができる。

なお、糖鎖をリポソームに結合させるには、リポソームの製造時にリンカー蛋白質および／または糖鎖を混合し、リポソームを製造させつつ糖鎖をその表面に結合させることも可能であるが、あらかじめリポソーム、リンカー蛋白質および糖鎖を別途準備し、製造が完了したリポソームにリンカー蛋白質および／または糖鎖を結合させたほうが望ましい。これは、リポソームにリンカー蛋白質および

／または糖鎖を結合させることにより、結合させる糖鎖の密度を制御できるからである。

糖鎖のリポソームへの直接結合は、以下に述べるような方法で行うことができる。

糖鎖を糖脂質として混合してリポソームを製造するか、製造後のリポソームのリン脂質に糖鎖を結合するとともに糖鎖密度を制御する。

リンカー蛋白質を用いて糖鎖を結合させる場合、リンカー蛋白質としては、例えば、ヒト血清アルブミン（HSA）、ウシ血清アルブミン（BSA）等の動物の血清アルブミンが挙げられるが、特にヒト血清アルブミンを使用する場合は、各組織に対する取り込みが多いことがマウスについての実験により確かめられている。

また、後述のように、本発明の標的指向性リポソームを医薬として用いる場合、該リポソームは医薬効果を有する化合物を含んでいる必要がある。該医薬効果を有する化合物は、リポソーム中に封入させるか、あるいはリポソーム表面に結合させればよい。

糖鎖をリンカー蛋白質を介してリポソームへ結合させるには以下に述べる方法で行えばよい。

まずリポソーム表面に蛋白質を結合させる。リポソームを、 NaIO_4 、 $\text{Pb}(\text{OCCCH}_3)_4$ 、 NaBiO_3 等の酸化剤で処理して、リポソーム膜面に存在するガングリオシドを酸化し、次いで、 NaBH_3CN 、 NaBH_4 等の試薬を用いて、リンカー蛋白質とリポソーム膜面上のガングリオシドを、還元的アミノ化反応により結合させる。このリンカー蛋白質も、親水性化するのが好ましく、これにはリンカー蛋白質にヒドロキシ基を有する化合物を結合させるが、例えば、ビススルフォスクシニミチルスペラート、ジスクシニミチルグルタレート、ジチオビススクシニミチルプロピオネート、ジスクシニミチルスペラート、3,3'-ジチオビススルフォスクシニミチルプロピオネート、エチレングリコールビススクシニミチルスクシネート、エチレングリコールビススルフォスクシニミチルスクシネート等の2価試薬を用いて、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンをリポソーム上のリンカー蛋白質と結合させればよい。

これを具体的に述べると、まず、リンカー蛋白質の全てのアミノ基に架橋用2価試薬の一端を結合する。そして、各種糖鎖の還元末端をグリコシルアミノ化反応して得られる糖鎖グリコシルアミン化合物を調製し、この糖鎖のアミノ基とリポソーム上の上記で結合された架橋2価試薬の一部分の他の未反応末端とを結合する。

次に、このようにして得られる糖鎖結合リポソーム膜面上蛋白質の表面に糖鎖が結合していない未反応で残っている大部分の2価試薬未反応末端を用いて親水性化処理を行う。つまり、このリポソーム上蛋白質に結合している2価試薬の未反応末端とトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン等の上述の親水性化に用いる化合物との結合反応を行い、リポソーム表面全体を親水性化する。

リポソーム表面およびリンカー蛋白質の親水性化は、各種組織への移行性、および血中における滞留性および各種組織への移行性を向上させる。これは、リポソーム表面およびリンカー蛋白質表面が親水性化されることによって、糖鎖以外の部分が、各組織等においてはあたかも生体内水分であるかのようにみえ、これにより、標的以外の組織等に認識されず、糖鎖のみがその標的組織のレクチン(糖鎖認識蛋白質)により認識されることに起因するものと思われる。

次いで、糖鎖をリポソーム上のリンカー蛋白質に結合させる。これには、糖鎖を構成する糖類の還元末端を、 NH_2HCO_3 、 $\text{NH}_2\text{COOONH}_4$ 等のアンモニウム塩を用いてグリコシルアミノ化し、次いで、ビススルフォスクシニミヂルスペラート、ジスクシニミヂルグルタレート、ジチオビススクシニミヂルプロピオネート、ジスクシニミヂルスペラート、3,3'-ジチオビススルフォスクシニミヂルプロピオネート、エチレングリコールビススクシニミヂルスクシネート、エチレングリコールビススルフォスクシニミヂルスクシネート等の2価試薬を用いて、リポソーム膜面上に結合したリンカー蛋白質と、上記グリコシルアミノ化された糖類とを結合させ、図1～22に示されるようなりポソームを得る。なお、これらの糖鎖は市販されている。

本発明のリポソームの粒径は、30～500nm、好ましくは50～300nm、さらに好ましくは70～150nmである。また、ゼータ電位は、-50～10mV、好ましくは-40～0mV、さらに好ましくは-30～-10mVである。本発明の医薬組成物に含まれるリポソーム

製造の過程において、表面に何も結合していないリポソーム、親水性化されておらず糖鎖が結合したリポソーム、糖鎖が結合しておらず親水性化されたリポソームおよび親水性化され糖鎖が結合したリポソームの4つの態様のリポソームが存在し得るが、これらの4つの態様のリポソームが生理食塩水などの等張液において前記粒径の範囲およびゼータ電位の範囲に包含される。

さらに、糖鎖を結合させた場合の糖鎖の結合密度は、リポソームに結合させるリンカー蛋白質1分子当り1～60個、好ましくは1～40個、さらに好ましくは1～20個である。また、リポソーム1粒子当りは、リンカー蛋白質を用いる場合は、1～30000個、好ましくは1～20000個、さらに好ましくは1～10000個、あるいは100～30000個、好ましくは100～20000個、さらに好ましくは100～10000個、あるいは500～30000個、好ましくは500～20000個、さらに好ましくは500～10000個である。リンカー蛋白質を用いない場合は、リポソーム1粒子当り最高1～500000個、好ましくは1～300000個、さらに好ましくは1～100000個以上の糖鎖を結合させることができる。

(2) 本発明の標的指向性リポソームを含む炎症性疾患治療用組成物

本発明は、上記シアリルルイスX型糖鎖またはこれと同様にE-セレクチン、P-セレクチン等に反応することができる糖鎖を糖鎖の種類および密度を制御して表面に結合した標的指向性リポソームを含む炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物を包含する。さらに、本発明は親水性化化合物を用いて親水性化した糖鎖の結合していないリポソームを含む炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物を包含する。

本発明の、炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物が対象とする炎症性疾患としては、限定されないが、脳炎、炎症性眼疾患、耳炎、咽頭炎、肺炎、胃炎、腸炎、肝炎、肺炎、腎炎、膀胱炎、尿道炎、子宮体炎、膿炎、関節炎、末梢神経炎などの一般的炎症性疾患が挙げられ、さらに悪性腫瘍、感染性疾患、アレルギー性疾患、自己免疫疾患（リウマチ、全身性エリテマトーデス、サルコイドーシスなど）、虚血性疾患（心筋梗塞、脳梗塞など）、代謝性疾患（糖尿病、痛風など）、外傷・熱傷・化学腐食、神経変性疾患（アルツハイマー病など）などの続発的に炎症を引き起こす炎症性疾患が挙げられる。炎症性疾患治療用または診断用医薬

組成物が適応できる対象器官、組織も限定されず動物のあらゆる器官および組織を対象とし得る。また、炎症性眼疾患としては、限定されないが、ぶどう膜炎を含む内眼炎、糖尿病網膜症、血管新生黄斑症、アレルギー性結膜炎、眼窩および眼内腫瘍、視神経炎、強膜炎（後部強膜炎を含む）等が挙げられる。

本発明の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物が含む標的指向性リポソームは、炎症性疾患治療用の医薬効果を有する化合物を含み、それらの化合物は限定されないが、副腎皮質ホルモン、抗炎症薬、免疫抑制剤、抗がん剤、抗菌薬、抗ウイルス薬、血管新生抑制剤、サイトカインやケモカイン、抗サイトカイン抗体や抗ケモカイン抗体、抗サイトカイン・ケモカイン受容体抗体、siRNA や DNA などの遺伝子治療関連の核酸製剤、神経保護因子等が挙げられる。

副腎皮質ホルモンとしては、コルチゾール、コルチゾン等の天然副腎皮質ホルモン(糖質コルチコイド)や、プレドニゾロン、リン酸プレドニゾロン、デキサメサゾン、リン酸デキサメサゾン、ベタメサゾン、フルオシノロンアセトニド、トリアムシノロンや等の合成副腎皮質ホルモンが挙げられる。また、その他の抗炎症薬として、アスピリンなどのサリチル酸類、インドメタシンなどのインドール酢酸誘導体、ジクロフェナク等のフェニル酢酸誘導体、メフェナム酸などのフェナム酢酸誘導体が挙げられる。さらに、エトドラク、メロキシカム、セレキシコブ Rofecoxib, MK-0966 等の選択的 COX-2 阻害剤も挙げられる。

本発明において、上述の薬剤にはその誘導体も包含される。

本発明の糖鎖修飾リポソームにこれらの薬剤を含ませて投与した場合、薬剤を単独で投与した場合に比較し、薬剤が炎症部位に集積する。単独投与の場合に比べ、2 倍以上、好ましくは5 倍以上、さらに好ましくは10 倍以上、特に好ましくは50 倍以上集積し得る。

これらの、化合物は、リポソーム中に封入されていても、リポソーム表面に結合していくもよいが、リポソーム中に封入されているのが望ましい。これらの化合物は、その化合物が有する官能基を利用することにより、公知の方法で、結合させることができる。

リポソーム内部への封入は、以下の方法により行う。リポソームへ薬剤等を封入するには、周知の方法を用いればよく、例えば、薬剤等の含有溶液とフォスフ

アチジルコリン類、フォスファチジルエタノールアミン類、フォスファチジン酸類もしくは長鎖アルキルリン酸塩類、ガングリオシド類、糖脂質類もしくはフォスファチジルグリセロール類およびコレステロール類を含む脂質を用いてリポソームを形成することにより、薬剤等はリポソーム内に封入される。

本発明の医薬組成物は、シリルルイス X 型糖鎖またはこれと同様に E-セレクチン、P-セレクチン等に反応することができる糖鎖を糖鎖の種類および密度を制御して表面に結合した標的指向性リポソームまたは親水性化化合物を用いて親水性化した糖鎖の結合していないリポソームの他に薬理学的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤等を含んでいてもよい。本発明の医薬組成物は、種々の形態で投与することができる。このような投与形態としては、点眼剤等による点眼投与、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤等による経口投与、あるいは注射剤、点滴剤、座薬などによる非経口投与を挙げることができる。かかる組成物は、公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤、賦形剤を含む。たとえば、錠剤用の担体、賦形剤としては、ゲル化剤、乳糖、ステアリン酸マグネシウムなどが使用される。注射剤は、本発明の糖鎖結合リポソームを通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製する。注射用の水性液としては、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液などが使用され、適当な溶解補助剤、たとえばアルコール、プロピレングリコールなどのポリアルコール、非イオン界面活性剤などと併用しても良い。油性液としては、ゴマ油、大豆油などが使用され、溶解補助剤としては安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどを併用しても良い。

本発明の医薬組成物の投与経路は、限定されず、点眼、経口投与、静脈注射、筋肉注射等がある。投与量は、炎症性疾患の重篤度等により適宜決定できるが、本発明の組成物の医薬的に有効量を患者に投与する。ここで、「医薬的に有効量を投与する」とは、炎症性疾患を治療するのに適切なレベルの薬剤を患者に投与することをいう。本発明の医薬組成物の投与回数は適宜患者の症状に応じて選択される。

また、本発明の医薬組成物を診断用に用いる場合は、リポソームに蛍光色素、

放射性化合物等の標識化合物を結合させる。該標識化合物結合リポソームが患部に結合し、標識化合物が患部細胞に取り込まれ、該標識化合物の存在を指標に疾患を検出・診断することができる。

さらに、本発明を以下の実施例によって具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

実施例 1

リポソームの調製

リポソームは既報の手法 (Yamazaki, N., Kodama, M. and Gabius, H.-J. (1994) *Methods Enzymol.* 242, 56-65) により、改良型コール酸透析法を用いて調製した。すなわち、ジパルミトイルフォスファチジルコリン、コレステロール、ジセチルフォスフェート、ガングリオシド及びジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミンをモル比でそれぞれ 35 : 40 : 5 : 15 : 5 の割合の合計脂質量 45.6mg にコール酸ナトリウムを 46.9mg 添加し、クロロホルム／メタノール溶液 3ml に溶解した。この溶液を蒸発させ、沈殿物を真空中で乾燥させることによって脂質膜を得た。得られた脂質膜を TAPS 緩衝液 (pH 8.4) 3ml に懸濁、超音波処理して、透明なミセル懸濁液を得た。さらに、ミセル懸濁液を PM10 膜 (Amicon Co., USA) と PBS 緩衝液 (pH 7.2) を用いた限外濾過にかけ均一リポソーム (平均粒径 100nm) 10ml を調製した。

実施例 2

リポソーム脂質膜面上の親水性化処理

実施例 1 で調製したリポソーム溶液 10ml を XM300 膜 (Amicon Co., USA) と CBS 緩衝液 (pH 8.5) を用いた限外濾過にかけ溶液の pH を 8.5 にした。次に、架橋試薬 bis (sulfosuccinimidyl) suberate (BS³; Pierce Co., USA) 10ml を加え、25°Cで 2 時間攪拌した。その後、更に 7°Cで一晩攪拌してリポソーム膜上の脂質ジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミンと BS³との化学結合反応を完結した。そして、このリポソーム液を XM300 膜と CBS 緩衝液 (pH 8.5) で限外濾過にかけた。次に、CBS 緩衝液 (pH 8.5) 1ml に溶かした tris (hydroxymethyl) aminomethane 40mg をリポソーム液 10ml に加えて、25°Cで 2 時間攪拌後、7°Cで一晩攪拌してリポソーム膜上の脂質に結合した BS³と tris (hydroxymethyl) aminomethane との化学結

合反応を完結した。これにより、リポソーム膜の脂質ジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミン上に tris(hydroxymethyl) aminomethane の水酸基が配位して水和親水性化された。

実施例 3

リポソーム膜面上へのヒト血清アルブミン (HSA) の結合

既報の手法 (Yamazaki, N., Kodama, M. and Gabius, H.-J. (1994) Methods Enzymol. 242, 56-65) により、カップリング反応法を用いて行った。すなわち、この反応は 2 段階化学反応で行い、まずはじめに、実施例 2 で得られた 10ml のリポソーム膜面上に存在するガングリオシドを 1ml の TAPS 緩衝液 (pH 8.4) に溶かしたメタ過ヨウ素酸ナトリウム 43mg を加えて室温で 2 時間攪拌して過ヨウ素酸酸化した後、XM300 膜と PBS 緩衝液 (pH 8.0) で限外濾過することにより酸化されたりポソーム 10ml を得た。このリポソーム液に、20mg のヒト血清アルブミン (HSA) を加えて 25°C で 2 時間攪拌し、次に PBS (pH 8.0) に 2M NaBH₃CN 100 μl を加えて 10°C で一晩攪拌してリポソーム上のガングリオシドと HSA とのカップリング反応で HSA を結合した。そして、XM300 膜と CBS 緩衝液 (pH 8.5) で限外濾過をした後、HSA 結合リポソーム液 10ml を得た。

実施例 4

リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン (HSA) 上へのルイス X 型三糖鎖、シアリルルイス X 型四糖鎖、3' -シアリルラクトサミン三糖鎖、6' -シアリルラクトサミン三糖鎖、アルファ 1,2 マンノビオース二糖鎖、アルファ 1,3 マンノビオース二糖鎖、アルファ 1,4 マンノビオース二糖鎖、アルファ 1,6 マンノビオース二糖鎖、アルファ 1,3 アルファ 1,6 マンノトリオース三糖鎖、オリゴマンノース 3 五糖鎖、オリゴマンノース 4 b 六糖鎖、オリゴマンノース 5 七糖鎖、オリゴマンノース 6 八糖鎖、オリゴマンノース 7 九糖鎖、オリゴマンノース 8 十糖鎖またはオリゴマンノース 9 十一糖鎖の結合

ルイス X 型三糖鎖 (Calbiochem Co., USA) 50 μg を 0.25g の NH₄HCO₃ を溶かした 0.5ml 水溶液に加え、37°C で 3 日間攪拌した後、0.45 μm のフィルターで濾過して糖鎖の還元末端のアミノ化反応を完結してルイス X 型三糖鎖のグリコシルアミン化合物 50 μg を得た。次に、実施例 3 で得たリポソーム液の一部分 1ml に架橋試

薬 3, 3' -dithiobis (sulfosuccinimidyl propionate (DTSSP; Pierce Co., USA) 1mg を加えて 25°Cで 2 時間、続いて 7°Cで一晩攪拌し、XM300 膜と CBS 緩衝液 (pH 8. 5) で限外濾過して DTSSP がリポソーム上の HSA に結合したリポソーム 1mlを得た。次に、このリポソーム液に上記のルイス X型三糖鎖のグリコシルアミン化合物 50 μg を加えて、25°Cで 2 時間攪拌し、その後 7°Cで一晩攪拌し、XM300 膜と PBS 緩衝液 (pH 7. 2) で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上の DTSSP にルイス X型三糖鎖の結合を行った。その結果、図 1 で示されるルイス X型三糖鎖とヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したリポソーム 2ml (総脂質量 2mg、総蛋白量 200 μg、平均粒径 100nm) が得られた。他の糖鎖結合リポソームも用いる糖鎖を変えて同様の方法で作製した。これらの糖鎖結合リポソームは、図 2 から 16 に示した。

実施例 5

リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン (HSA) 上へのラクトース二糖鎖、2' - フコシルラクトース三糖鎖、ジフコシルラクトース四糖類、3-フコシルラクトース三糖鎖、3' - シアリルラクトース三糖鎖、6' - シアリルラクトース三糖鎖、3' - シアリルラクトサミン三糖鎖または 6' - シアリルラクトサミン三糖鎖の結合 (糖鎖結合量が異なるもの 3 種類)

ラクトース二糖鎖 (Wako Pure Chemical Co., Japan) (1) 50 μg、又は、(2) 200 μg、又は、(3) 1mg) を 0.25g の NH₄HCO₃ を溶かした 0.5ml 水溶液に加え、37°Cで 3 日間攪拌した後、0.45 μm のフィルターで濾過して糖鎖の還元末端のアミノ化反応を完結してラクトース二糖鎖のグリコシルアミン化合物 50 μgを得た。次に、実施例 3 で得たリポソーム液の一部分 1ml に架橋試薬 3, 3' -dithiobis (sulfosuccinimidyl propionate (DTSSP; Pierce Co., USA) 1mg を加えて 25°Cで 2 時間、続いて 7°Cで一晩攪拌し、XM300 膜と CBS 緩衝液 (pH 8. 5) で限外濾過して DTSSP がリポソーム上の HSA に結合したリポソーム 1mlを得た。次に、このリポソーム液に上記のラクトース二糖鎖のグリコシルアミン化合物 50 μg を加えて、25°Cで 2 時間攪拌し、その後 7°Cで一晩攪拌し、XM300 膜と PBS 緩衝液 (pH 7. 2) で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上の DTSSP にラクトース二糖鎖の結合を行った。その結果、糖鎖結合量が異なるもの 3 種類の図 17

で示されるラクトース二糖鎖とヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したりポソーム各 2ml (総脂質量 2mg、総蛋白量 200 μg、平均粒径 100nm) が得られた。他の糖鎖結合リポソームも用いる糖鎖を変えて同様の方法で作製した。他の糖鎖結合リポソームの構造を図 3、4 および 18～22 に示す。

実施例 6

リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン (HSA) 上への tris(hydroxymethyl) aminomethane の結合

比較試料としてのリポソームを調製するために、実施例 3 で得たリポソーム液の一部分 1ml に架橋試薬 3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl propionate) (DTSSP; Pierce Co., USA) 1mg を加えて 25°C で 2 時間、続いて 7°C で一晩攪拌し、XM300 膜と CBS 緩衝液 (pH 8.5) で限外濾過して DTSSP がリポソーム上の HSA に結合したりポソーム 1ml を得た。次に、このリポソーム液に tris(hydroxymethyl) aminomethane (Wako Co., Japan) 13mg を加えて、25°C で 2 時間攪拌し、その後 7°C で一晩攪拌し、XM300 膜と PBS 緩衝液 (pH 7.2) で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上の DTSSP に tris(hydroxymethyl) aminomethane の結合を行った。その結果、図 25 で示される tris(hydroxymethyl) aminomethane とヒト血清アルブミンとリポソームとが結合した比較試料としてのリポソーム 2ml (総脂質量 2mg、総蛋白量 200 μg、平均粒径 100nm) が得られた。

実施例 7

リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン (HSA) 上の親水性化処理

実施例 4 または 5 の手段により調整されたリポソームについて、以下の手順によりリポソーム上の HSA 蛋白質表面の親水性化処理を行った。糖鎖結合リポソーム 2ml に、tris(hydroxymethyl) aminomethane 13mg を加えて、25°C で 2 時間、その後 7°C で一晩攪拌した後、XM300 膜と PBS 緩衝液 (pH 7.2) で限外濾過し未反応物を除去して、最終産物である親水性化処理された糖鎖結合リポソーム複合体各 2ml (総脂質量 2mg、総蛋白量 200 μg、平均粒径 100nm) を得た。

実施例 8

各種の糖鎖結合リポソーム複合体によるレクチン結合活性阻害効果の測定

実施例 5 及び 6 の手段により調製した各 1~2 種の糖鎖結合リポソーム複合体の *in vitro* でのレクチン結合活性は、常法 (Yamazaki, N. (1999) Drug Delivery System, 14, 498-505) に従いレクチン固定化マイクロプレートを用いた阻害実験で測定した。すなわち、レクチン (E-selectin; R&D Systems Co., USA) を 96 穴マイクロプレートに固化定した。このレクチン固定化プレートに、比較リガンドであるビオチン化したフコシル化フェチュイン $0.1 \mu\text{g}$ とともに、濃度の異なる各種の糖鎖結合リポソーム複合体（蛋白質量として、 $0.01 \mu\text{g}$ 、 $0.04 \mu\text{g}$ 、 $0.11 \mu\text{g}$ 、 $0.33 \mu\text{g}$ 、 $1 \mu\text{g}$ ）を加え、 4°C で 2 時間インキュベートした。PBS (pH 7.2) で 3 回洗浄した後、horseradish peroxidase (HRPO) 結合ストレプトアビシンを添加し、さらに 4°C で 1 時間インキュベート、PBS (pH 7.2) で 3 回洗浄し、ペルオキシダーゼ基質を添加して室温で静置、405nm の吸光度をマイクロプレートリーダー (Molecular Devices Corp., USA) で測定した。フコシル化フェチュインのビオチン化は、sulfo-NHS-biotin reagent (Pierce Co., USA) 処理後、Centricon-30 (Amicon Co., USA) により精製した。HRPO 結合ストレプトアビシンは、HRPO の酸化と NaBH_3CN を用いた還元アミノ化法によるストレプトアビシンの結合により調製した。この測定結果を表 1 から 4 に示す。

表中のリポソーム複合体の記号は、リポソームに以下の糖鎖が結合していることを示す。

LX : ルイス X 型三糖鎖

SLX : シアリルルイス X 型四糖鎖

3SLN : 3' -シアリルラクトサミン三糖鎖

6SLN : 6' -シアリルラクトサミン三糖鎖

A2 : アルファ 1,2 マンノビオース二糖鎖

A3 : アルファ 1,3 マンノビオース二糖鎖

A4 : アルファ 1,4 マンノビオース二糖鎖

A6 : アルファ 1,6 マンノビオース二糖鎖

A36 : アルファ 1,3 アルファ 1,6 マンノトリオース三糖鎖

Man3 : オリゴマンノース 3 五糖鎖

Man46 : オリゴマンノース 4 b 六糖鎖

Man5：オリゴマンノース5七糖鎖
 Man6：オリゴマンノース6八糖鎖
 Man7：オリゴマンノース7九糖鎖
 Man8：オリゴマンノース8十糖鎖
 Man9：オリゴマンノース9十一糖鎖
 LAC：ラクトース二糖鎖
 FL：2'-フコシルラクトース三糖鎖
 DFL：ジフコシルラクトース四糖類
 FL：3-フコシルラクトース三糖鎖
 3SL：3'-シアリルラクトース三糖鎖
 6SL：6'-シアリルラクトース三糖鎖
 3SLN：3'-シアリルラクトサミン三糖鎖
 6SLN：6'-シアリルラクトサミン三糖鎖

表に示すように、各リポソームはレクチンとの結合活性を有しており、このことは糖鎖が結合していることを示している。

表 1

リポソーム 複合体	リポソーム複合体の各濃度 (μg 蛋白質) における阻害効果 (吸光度)				
	0.01 μg	0.04 μg	0.11 μg	0.33 μg	1 μg
LX	0.199	0.195	0.195	0.195	0.129
SLX	0.105	0.100	0.100	0.084	0.073
3SLN	0.175	0.158	0.144	0.131	0.095
6SLN	0.256	0.245	0.233	0.200	0.151

表 2

リポソーム 複合体	リポソーム複合体の各濃度 (μg 蛋白質) における阻害効果 (吸光度)				
	0.006 μg	0.02 μg	0.06 μg	0.17 μg	0.5 μg
A2	0.192	0.196	0.192	0.169	0.155
A3	0.178	0.178	0.178	0.170	0.142
A4	0.192	0.196	0.192	0.175	0.153
A6	0.182	0.196	0.182	0.169	0.151
A36	0.205	0.215	0.205	0.192	0.150
Man3	0.201	0.211	0.201	0.177	0.144
Man4	0.171	0.203	0.171	0.157	0.148
Man5	0.215	0.221	0.215	0.196	0.164
Man6	0.210	0.222	0.210	0.207	0.125
Man7	0.213	0.214	0.213	0.183	0.137
Man8	0.211	0.216	0.211	0.188	0.132
Man9	0.208	0.211	0.208	0.186	0.135

表 3

リポソーム 複合体	リポソーム複合体の各濃度 (μg 蛋白質) における阻害効果 (吸光度)				
	0.01 μg	0.04 μg	0.11 μg	0.33 μg	1 μg
LAC-1	0.115	0.114	0.112	0.112	0.105
LAC-2	0.112	0.109	0.104	0.104	0.097
LAC-3	0.119	0.118	0.112	0.109	0.108
2FL-1	0.121	0.115	0.106	0.097	0.067
2FL-2	0.131	0.119	0.116	0.111	0.079
2FL-3	0.149	0.133	0.122	0.104	0.073
DFL-1	0.167	0.158	0.146	0.131	0.108
DFL-2	0.136	0.134	0.133	0.120	0.106
DFL-3	0.163	0.150	0.134	0.118	0.097
3FL-1	0.138	0.131	0.121	0.113	0.085
3FL-2	0.148	0.134	0.128	0.123	0.092
3FL-3	0.149	0.134	0.129	0.128	0.110

表 4

リポソーム 複合体	リポソーム複合体の各濃度 (μg 蛋白質) における阻害効果 (吸光度)				
	0.01 μg	0.04 μg	0.11 μg	0.33 μg	1 μg
3SL-1	0.154	0.147	0.135	0.120	0.097
3SL-2	0.149	0.142	0.124	0.118	0.098
3SL-3	0.214	0.214	0.210	0.183	0.167
6SL-1	0.177	0.171	0.167	0.160	0.114
6SL-2	0.196	0.184	0.169	0.160	0.159
6SL-3	0.214	0.207	0.196	0.192	0.183
3SLN-1	0.219	0.198	0.180	0.164	0.119
3SLN-2	0.155	0.155	0.151	0.119	0.096
3SLN-3	0.216	0.198	0.187	0.146	0.132
6SLN-1	0.257	0.246	0.233	0.200	0.151
6SLN-2	0.250	0.250	0.230	0.199	0.158
6SLN-3	0.248	0.231	0.227	0.201	0.144

実施例 9

ぶどう膜炎モデルマウスの作成

実験的ぶどう膜炎 (Experimental Autoimmune Uveoretinitis : 以下 EAU) モデルマウスの作出には、以下の材料を用いた。

実験動物 : C57BL/6 マウス (雌、8 週齢)

接種抗原 : ヒト網膜特異的蛋白 IRBP (Interphotoreceptor Retinoid Binding Protein)

合成ペプチド 配列 GPTHLFQPSLVLDMAKVLLD (1-20)

アジュバント : 結核 (H37RA) 死菌 6 mg/ml 含有 complete Freund's adjuvant (CFA)

増幅効果剤 : 百日咳毒素 (Purified Bordetella pertussis toxin (PTX))

ペプチド水溶液とアジュバントを容積比で 1 : 1 に混和し乳濁液として調製する。8 週齢の C57BL/6 雌マウスに 1 匹あたり、足背皮下 50 μg・鼠径部皮下 50 μg、合計 200 μg 接種する。1 匹あたり 100ng の百日咳毒素を追加アジュバントとして腹腔内投与する。EAU 発症の程度は、0.5% トロピカミド・0.5% 塩酸フェニレフリンにより瞳孔を散大させ眼底観察することにより評価した。

結果は図 24 に提示する。EAU は投与 16 日目をピークに発症した。

ペプチド投与後 16 日目において炎症細胞が脈絡膜、網膜、硝子体腔に浸潤しているのが観察できる。

本方法でヒトの内眼炎モデルである EAU が作成されていることが確認された。

実施例 10

リポソームの生体内動態検討

投与リポソームは、上記実施例で作製した糖鎖結合リポソームのうち、シアリルルイス X 糖鎖結合リポソーム (以下糖鎖+リポソーム) および糖鎖の結合していないリポソーム (以下糖鎖-リポソーム) であった。

EAU マウスおよび正常マウスに対し、糖鎖+リポソーム、糖鎖-リポソームをそれぞれ投与し、マウスの各臓器へのリポソームの集積を評価することを目的として行った。

ペプチド投与 16 日目に EAU 発症を確認した EAU マウスおよび正常マウスを用意する。あらかじめ $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ に調製したリポソーム溶液をマウスの尾静脈より静注し、静注後ヘパリン生食で脱血還流の後、各臓器を摘出した。各臓器は 1 % Triton X 溶液と HG30 ホモゲナイザー（日立工機）を用いて組織ホモジネートとして調製の後、100%メタノールとクロロホルムを用いて組織ホモジネートに含まれるリポソームを抽出した。リポソーム量は、リポソームに結合した FITC の蛍光強度を蛍光マイクロプレートリーダー Biolumin 960（モレキュラーダイナミック社）を用いて行い、490nm の excitation と 520nm の emission で計測した。

リポソーム投与後、眼において集積の時間経過を調べた。その結果 30 分をピークにして集積することが明らかとなった。従って、各臓器での集積検討はリポソーム投与 30 分後に時間設定して行った。結果は図 2.5 A および図 2.5 B に提示する。図 2.5 A は集積量で示し、図 2.5 B は、正常マウスに対する相対値 % で示す。まず、正常マウスでは各臓器において糖鎖+リポソームと糖鎖-リポソームの集積に差は認めない。一方、EAU マウスの眼では糖鎖+リポソームは正常マウスの眼の 6 倍の集積を認めた。しかし糖鎖-リポソームでは EAU マウスの眼への集積は正常マウスに比較し 1.5 倍にとどまっている。EAU マウスの眼以外の臓器においては糖鎖+リポソームと糖鎖-リポソームの集積に著明な差は認めず、その値は正常マウスのそれと比較してもほぼ同程度であった。

炎症を起こした眼でのみリポソームの取り込みの増加を認めた。糖鎖-リポソームが EAU マウスの眼で正常マウスの眼の 1.5 倍の取り込みを認めたのは血管内皮細胞間隙の拡大によるものと考えられる (passive transport)。一方、糖鎖+リポソームが EAU マウスの眼で正常マウスの眼の 6 倍の集積 (すなわち糖鎖-リポソームと比較して約 4 倍の集積) を認めたことは炎症部位に発現した E-セレクチン、P-セレクチンを標的としたためと考えられる (active transport)。

実施例 1 1

リポソームの炎症部位への集積

炎症臓器（眼）のどの部位にリポソームの集積が生じるかを評価することを目的として行った。

ペプチド免疫後 16 日目の EAU 発症マウスの尾静脈よりリポソームを投与。30

分後にマウス眼球を摘出しそのまま OCT コンパウンドに包埋・凍結した。クライオトームを用いて 6~8 μ m 凍結切片を作製し AxioVision (カールツァイス社) を用いて観察した。

結果は図 2 6 に提示する。EAU マウスに糖鎖+リポソームを投与すると、投与後 5 分において強膜に集積が認められ、7 分において脈絡膜の脈絡膜毛細管板に当たる部位に細い 1 筋の集積が認められる。投与後 10 分ではその集積ラインが拡大しているのが観察できる。30 分では、集積ラインは薄まり、周囲の組織への蛍光物質の拡散が観察できる (図 2.6)。一方、糖鎖-リポソームでは集積ラインの形成は認められず、30 分においても明らかな蛍光物質の貯留、拡散は観察できない (図 2.6-F)。また、正常マウスにおいてはいずれのリポソームにおいても蛍光物質は確認できない (図 2.7)。

血管の最も豊富な脈絡膜毛細管板から糖鎖+リポソームの集積が開始され、時間とともに周囲の組織に拡散していくというリポソームの炎症部位での動態があきらかとなった。これは糖鎖+リポソームが炎症部位の血管に発現している E-セレクチン、P-セレクチンを標的として集積し、その後、炎症により拡大した血管内皮細胞間隙を通って周囲組織に拡散していくものと考えることができる。一方、糖鎖-リポソームで明確な蛍光色素が観察できなかったのは、このリポソームの炎症部位への集積が passive transport であるため、糖鎖+リポソームのように標的となって集積する部位がなく、個々ばらばらに組織に拡散していくためと考えられる。

実施例 1 2

E-セレクチン、P-セレクチンの発現

E-セレクチン、P-セレクチンが EAU マウス眼において確かに発現しているのか、そしてその発現部位が糖鎖+リポソームが最初に集積した集積ラインと一致しているかを確認することを目的として行った。

EAU 発症マウス、正常マウスを準備する。眼球摘出後 4 % グルタルアルデヒドで固定し 30 % シュクロース PBS で脱水した眼球を OCT コンパウンドに包埋・凍結する。

(1) 蛍光抗体法による検出：14 から 16 μ m の凍結切片を用いて、プロッキング

の後、抗マウス E-selectin 1 次抗体（ポリクローナル抗体：ヤギ）を反応させる。 FITC 結合の抗ヤギ IgG 二次抗体によりシグナルを検出した。

（2）酵素抗体法による検出：抗マウス E-selectin および P-selectin 1 次抗体（ポリクローナル抗体：ヤギ）による反応は蛍光抗体法と同様に行い、二次抗体反応は、VECTASTAIN（登録商標） ABC-AP kit および Vector（登録商標） Red Alkaline Phosphatase Substrate kit I を用いて行った。

どちらの検出方法においても、免疫染色の特異性を確認するために、抗体を購入した会社からそれぞれの抗体作成に使用したペプチドを購入し、ブロッキングペプチドとして用い染色が消失するかいかないかを確認した。

結果は図 28 および 29 に提示する。E-セレクチン、P-セレクチンとともに糖鎖+リポソームの集積ラインに一致した部位で強く発現していることが観察できた。また、使用した抗体に対する中和ペプチドにより染色が消失したことはこの免疫染色の特異性を示すものと考えられた。一方、正常マウスでは E-セレクチン、P-セレクチンとともに発現を認めなかった。

EAU マウスにおける E-セレクチン、P-セレクチンの発現部位と糖鎖+リポソームの集積部位が一致したことは、このリポソームの標的が E-セレクチン、P-セレクチンであるという理論を支持するものである。

実施例 1 3

E-セレクチンと P-セレクチンの抗体投与による糖鎖+リポソームの集積阻害

糖鎖+リポソームの標的分子が確かに E-セレクチンと P-セレクチンであることを示すことを目的として行った。

EAU 発症マウスの尾静脈より抗マウス E-selectin 抗体 200 μg、抗マウス P-selectin 抗体 200 μg を同時投与し 4 時間待ち、受容体を中和する。コントロールとして、EAU 発症マウスの尾静脈より 400 μg のアイソタイプ IgG を投与したものを用意する。投与 4 時間後、糖鎖+リポソームを尾静脈より投与し 10 分後眼球摘出し凍結標本を作製する。6~8 μm の凍結切片を作製し AxioVision を用いて、リガンド-受容体特異的結合が阻害されるか解析する。

結果を図 30 に提示する。E-セレクチンと P-セレクチンの抗体を同時に EAU マウスに投与することで糖鎖+リポソームの集積を阻害することができた。アイソタ

イプ IgG の投与では集積を阻害することはできなかった。また、E-セレクチンと P-セレクチンのそれぞれの抗体単独投与では完全には集積を阻害することはできなかった。

この結果と、実施例 1 1 で示した結果を併せて考えると、糖鎖+リポソームの標的は E-セレクチンと P-セレクチンであると結論できる。

以上の実験結果より、シアリルルイス X 糖鎖結合リポソームは E-セレクチンと P-セレクチンを多く発現している病巣部位特異的に薬剤をデリバリーできることが示された。

実施例 1 4 リン酸プレドニゾロン封入りリポソームの調製

(1) リン酸プレドニゾロン封入りリポソームの調製と封入薬物定量と保存安定性

リポソームはコール酸透析法を用いて調製した。すなわち、ジパルミトイルフォスファチジルコリン、コレステロール、ジセチルfosフェート、ガングリオシド及びジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミンをモル比でそれぞれ 35 : 40 : 5 : 15 : 5 の割合で合計脂質量 45.6mg になるように混合し、コール酸ナトリウム 46.9mg 添加し、クロロホルム／メタノール溶液 3ml に溶解した。この溶液を蒸発させ、沈殿物を真空中で乾燥させることによって脂質膜を得た。得られた脂質膜を TAPS 緩衝液 (pH8.4) 3ml に懸濁、超音波処理し、透明なミセル懸濁液 3ml を得た。このミセル懸濁液に PBS 緩衝液 (pH7.2) を加えて 5ml にしてから、更に TAPS 緩衝液 (pH8.4) で 2250mg/6ml になるよう完全に溶解したリン酸プレドニゾロンを攪拌しながらゆっくりと滴下して均一に混合した後、このリン酸プレドニゾロン入りミセル懸濁液を PM10 膜 (AmiconCo., USA) と TAPS 緩衝液 (pH8.4) を用いた限外濾過にかけ均一なリン酸プレドニゾロン封入りリポソーム 10ml を調製した。得られた生理食塩懸濁液中 (37°C) のリン酸プレドニゾロン封入りリポソーム粒子の粒子径とゼータ電位をゼータ電位・粒子径・分子量測定装置 (Model Nano ZS, Malvern Instruments Ltd., UK) により測定した結果、粒子径は 50~350nm、ゼータ電位は -30~-10mV であった。このリポソームの封入薬物量を吸光度 260nm で測定するとおよそ 280 μg/ml の濃度でリン酸プレドニゾロンが封入されていることがわかった。このリン酸プレドニゾロン封入りリポソームは、冷蔵庫中

に1年間保存した後にも沈殿や凝集を起こすことなく安定であった。

(2) リン酸プレドニゾロン封入りポリソーム脂質膜面上の親水性化処理

(1) で調製したリン酸プレドニゾロン封入りポリソーム溶液 10ml を XM300 膜 (Amicon Co., USA) と CBS 緩衝液 (pH 8.5) を用いた限外濾過にかけ溶液の pH を 8.5 にした。次に、架橋試薬 bis(sulfosuccinimidyl) suberate. (BS3; Pierce Co., USA) 10ml を加え、25°Cで2時間攪拌した。その後、更に7°Cで一晩攪拌してリポソーム膜上の脂質ジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミンと BS3 との化学結合反応を完結した。そして、このリポソーム液を XM300 膜と CBS 緩衝液 (pH 8.5) で限外濾過にかけた。次に、CBS 緩衝液 (pH 8.5) 1ml に溶かした tris(hydroxymethyl) aminomethane 40mg をリポソーム液 10ml に加えて、25°Cで2時間攪拌後、7°Cで一晩攪拌してリポソーム膜上の脂質に結合した BS3 と tris(hydroxymethyl) aminomethane との化学結合反応を完結した。これにより、抗癌剤ドキソルビシン封入りポリソーム膜の脂質ジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミン上に tris(hydroxymethyl) aminomethane の水酸基が配位して水和親水性化された。

(3) リン酸プレドニゾロン封入りポリソーム膜面上へのヒト血清アルブミン (HSA) の結合

既報の手法 (Yamazaki, N., Kodama, M. and Gabius, H.-J. (1994) Methods Enzymol. 242, 56-65) により、カップリング反応法を用いて行った。すなわち、この反応は2段階化学反応で行い、まずはじめに、(2) で得られた 10ml のリポソーム膜面上に存在するガングリオシドを 1ml の TAPS 緩衝液 (pH 8.4) に溶かしたメタ過ヨウ素酸ナトリウム 43mg を加えて室温で2時間攪拌して過ヨウ素酸酸化した後、XM300 膜と PBS 緩衝液 (pH 8.0) で限外濾過することにより酸化されたりポソーム 10ml を得た。このリポソーム液に、20mg のヒト血清アルブミン (HSA) を加えて 25°Cで2時間攪拌し、次に PBS (pH 8.0) に 2M NaBH₃CN 100 μl を加えて 10°C で一晩攪拌してリポソーム上のガングリオシドと HSA とのカップリング反応で HSA を結合した。そして、XM300 膜と CBS 緩衝液 (pH 8.5) で限外濾過をした後、HSA 結合リン酸プレドニゾロン封入りポリソーム液 10ml を得た。

(4) リン酸プレドニゾロン封入りポリソーム膜面結合ヒト血清アルブミン (HSA)

上へのシアリルルイス X 型四糖鎖の結合とリンカー蛋白質 (HSA) の親水性化処理

シアリルルイス X 型四糖鎖 (Calbiochem Co., USA) 50 μg を 0.25g の NH₄HCO₃ を溶かした 0.5ml 水溶液に加え、37°Cで 3 日間攪拌した後、0.45 μm のフィルターで濾過して糖鎖の還元末端のアミノ化反応を完結してシアリルルイス X 型四糖鎖のグリコシルアミン化合物 50 μg を得た。次に、(3) で得たリン酸プレドニゾロン封入りポソーム液の一部分 1ml に架橋試薬 3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl) propionate (DTSSP; Pierce Co., USA) 1mg を加えて 25°Cで 2 時間、続いて 7°Cで一晩攪拌し、XM300 膜と CBS 緩衝液 (pH 8.5) で限外濾過して DTSSP がリポソーム上の HSA に結合したリポソーム 1ml を得た。次に、このリポソーム液に上記のシアリルルイス X 型四糖鎖のグリコシルアミン化合物 50 μg を加えて、25°Cで 2 時間攪拌し、その後 7°Cで一晩攪拌し、XM300 膜と PBS 緩衝液 (pH 7.2) で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上の DTSSP にシアリルルイス X 型四糖鎖の結合を行った。次に、このリポソーム液に tris(hydroxymethyl) aminomethane (Wako Co., Japan) 13mg を加えて、25°Cで 2 時間攪拌し、その後 7°Cで一晩攪拌し、XM300 膜と PBS 緩衝液 (pH 7.2) で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上の DTSSP に tris(hydroxymethyl) aminomethane の結合を行った。その結果、tris(hydroxymethyl) aminomethane とヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したリンカー蛋白質 (HSA) の親水性化処理をしたリポソームを得た。その結果、シアリルルイス X 型四糖鎖とヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したリンカー蛋白質 (HSA) の親水性化処理をしたリン酸プレドニゾロン封入りポソーム 2ml (総脂質量 2mg、総蛋白量 200 μg) が得られた。得られた生理食塩懸濁液中 (37°C) のリン酸プレドニゾロン封入りポソーム粒子の粒子径とゼータ電位をゼータ電位・粒子径・分子量測定装置 (Model Nano ZS, Malvern Instruments Ltd., UK) により測定した結果、粒子径は 50~350nm、ゼータ電位は -30~-10mV であった。

(5) リン酸プレドニゾロン封入りポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン (HSA) 上への tris(hydroxymethyl) aminomethane の結合によるリンカー蛋白質 (HSA) の親水性化処理

比較試料としてのリン酸プレドニゾロン封入りポソーム (糖鎖を付けないもの)

を調製するために、(3)で得たリン酸プレドニゾロン封入りリポソーム液の一部分1mlに架橋試薬3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl) propionate(DTSSP; Pierce Co., USA)1mgを加えて25℃で2時間、続いて7℃で一晩攪拌し、XM300膜とCBS緩衝液(pH 8.5)で限外濾過してDTSSPがリポソーム上のHSAに結合したリンカーアルブミン(HSA)の親水性化処理リポソーム1mlを得た。次に、このリポソーム液にtris(hydroxymethyl) aminomethane(Wako Co., Japan)13mgを加えて、25℃で2時間攪拌し、その後7℃で一晩攪拌し、XM300膜とPBS緩衝液(pH 7.2)で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上のDTSSPにtris(hydroxymethyl) aminomethaneの結合を行った。その結果、tris(hydroxymethyl) aminomethaneとヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したリンカーアルブミン(HSA)の親水性化処理をした比較試料としてのリン酸プレドニゾロン封入りリポソーム(糖鎖を付けないもの)2ml(総脂質量2mg、総蛋白量200μg)が得られた。得られた生理食塩懸濁液中(37℃)のリン酸プレドニゾロン封入りリポソーム粒子(糖鎖を付けないもの)の粒子径とゼータ電位をゼータ電位・粒子径・分子量測定装置(Model Nano ZS, Malvern Instruments Ltd., UK)により測定した結果、粒子径は50~350nm、ゼータ電位は-30~-10mVであった。

本実施例で作製したリポソームを以下の実施例15および16の検討に用いた。

実施例15 炎症部位への薬剤集積効果

EAU発症マウスの各臓器におけるE-セレクチンの発現を検討することを目的として行った。

リン酸プレドニゾロン1mgをマウス尾静脈から投与し、E-セレクチンの発現を認めた臓器において、1時間後の各臓器における単位重量あたりのプレドニゾロン濃度をHPLCにて測定した。次いで、今回開発したE-セレクチン標的指向性的シアリルルイスX糖鎖付きリポソーム(以下糖鎖付きリポソーム)にリン酸プレドニゾロンを内包させたものを投与(リン酸プレドニゾロン合計5μg)し、1時間後の各臓器における単位重量あたりのプレドニゾロン濃度をHPLCにて測定した。

以下の結果が得られた。

1. EAU発症マウスにおいては、眼以外に腸においてE-セレクチンの発現を認め

た。それ以外の臓器には発現を認めなかった。

2. リン酸プレドニゾロンを単独で 1 mg 投与した場合、眼には 100 ng、腸には 500 ng 集積していた。一方、糖鎖付きリポソーム（リン酸プレドニゾロン合計 5 μg 内包）を投与した場合、眼には 25 ng、腸には 2000 ng 集積していた。

本実施例の結果は、リン酸プレドニゾロンを単独で 1 mg 投与するのと同等の効果を炎症部位において得るのに、糖鎖付きリポソームを用いると、眼の炎症ではリン酸プレドニゾロン 20 μg で可能であり、腸ではわずか 1.25 μg で可能であることを示している。つまり、この糖鎖付きリポソームをデリバリーシステムとして用いると、眼では 50 倍の、腸では 800 倍の集積効果が得られることになる。

また、本実施例では、リン酸プレドニゾロンを投与して、測定はプレドニゾロンで測っている。リン酸プレドニゾロンは細胞内に取り込まれると、リン酸基が外れてプレドニゾロンになるので、今回の結果は、糖鎖付きリポソームで投与したリン酸プレドニゾロンが細胞内に取り込まれ、代謝されていることも同時に示している。

EAU 発症マウスの実験を総括すると、この糖鎖付きリポソームは E, P-セレクチンを選択的に標的としたものであり、最大 800 倍の集積効果を発揮するという従来には見られなかつた高精度の標的指向性を有することがあきらかとなった。また、この糖鎖付きリポソームに内包された薬剤が細胞内で代謝されていることも確認できた。以上より、本糖鎖付きリポソームを用いたドラッグデリバリーシステムは、今までの臨床医学で用いられていた薬剤効果を得るのに、投与する薬剤量を数百分の一に減量することができ、最大限の薬剤効果と最小限の副作用を可能にするものであると結論できる。

実施例 16 標的指向性リポソームによるリュウマチ性関節炎の治療の検討

(1) RA モデルマウスの作成

RA マウスマodelとしてタイプ II コラーゲン誘導関節炎 (Collagen type II induced arthritis 以下 CIA) モデルを作成した。用いたマウス、試薬類は以下の通りである。

実験動物：DBA/1J マウス（8 週齢、雄）

接種抗原：牛コラーゲン タイプ II

アジュヴァント：結核死菌 (H37Ra, 2 mg/ml) 含有 complete Freund's adjuvant (CFA), 結核死菌を含まない incomplete Freund's adjuvant (IFA)

コラーゲン水溶液と CFA を容積比 2 : 1 で混和し、100 μL にコラーゲンを 200 μg 含有する乳濁液を調整、これをマウスの尾底部皮下へ注射した (Day 0)。処置 21 日後 (Day 21) コラーゲン水溶液と IFA を容積比 2 : 1 で混和し、100 μL にコラーゲンを 200 μg 含有する乳濁液を調整し、再度マウス尾底部皮下へ注射した。

処置後 3 回／週の頻度でマウスの四肢を観察、以下の基準によりポイント化して炎症の定量化をした。それぞれの肢において、正常：0 ポイント、軽度炎症又は発赤：1 ポイント、重度発赤、腫脹又は使用の抑制：2 ポイント、手掌、足底部及び関節部の変形：3 ポイント(最低は 0 ポイント、最高で 12 ポイントとなる。) このポイントを以下の式で処理して Inflammatory Activity (以下 IA) を求めた。

$$\text{Inflammatory Activity (\%)} = \text{四肢の全てのポイント数} / 12 \times 100$$

以下の結果が得られた。

Day 21 から数日で後肢指に発赤が確認できるマウスが増加してきた。Day 28 でマウスの IA は 16.7% に、Day 39 で 50% に達した。図 3 1 に炎症を起こしたマウスの四肢の写真を提示する。CIA マウス関節炎の所見は以下の通りである。A : 後肢指間関節の腫脹 (第二指、矢印)、B : 後肢指間関節の腫脹 (第四指、矢印)、C : 後肢指間関節の発赤 (矢印)、D : 正常後肢、E : 前肢手関節の腫脹 (矢印)、F : 正常前肢

このように、上記方法により RA マウスモデルとして CIA マウスが作成できた。

(2) RA マウスを DDS の静脈内投与により治療する実験

関節炎を起こしているマウスに治療薬を尾静脈から注射して治療が施行された。静脈注射は Day 28 から Day 46 の期間で週 2 回の頻度であった。

Day 28 で炎症所見のあるマウスを選び、それぞれの群の炎症ポイントの平均が同じになるように 4 群に分けた。それぞれの群は 1) Control: 無治療群、2) free Pred: リン酸プレドニゾロンを生理食塩に溶かした水溶液を使用し、リン酸プレドニゾロンの量が一回 100 μg、週 200 μg 静脈注射した群、3) L-Pred: リン酸プレドニゾロンをリポゾームに包埋、糖鎖を付けないものを使用、リン酸プレド

ニゾロンの量が一回 $10\text{ }\mu\text{g}$ 、週 $20\text{ }\mu\text{g}$ 静脈注射した群、4) L-Pred-SLX: リン酸プレドニゾロンをリポソームに包埋、シアリルルイス X 糖鎖を結合させたものを使用、リン酸プレドニゾロンの量が一回 $10\text{ }\mu\text{g}$ 、週 $20\text{ }\mu\text{g}$ 静脈注射した群、の4群であった。

この4群のマウスの数は Control: 6匹、free Pred: 7匹、L-Pred: 8匹、L-Pred-SLX: 8匹であった。

以下の結果が得られた。Controlでは経時的にIAが上昇し、Day 46の時点で60%を突破した。free PredではDay 37でIAが約50%に達した後平衡状態で推移した。L-PredではDay 32からIAが上昇し始めDay 46では約40%であった。L-Pred-SLXではIAの大きな上昇は観察されず、全経過を通して20%以下であった(図32)。

この結果より以下のことが判明した。

free Pred群では静脈注射されたリン酸プレドニゾロン量 $100\text{ }\mu\text{g/injection}$ では炎症をコントロールするには不十分であり、Control群と比してIAは明らかな差は観られなかった。L-Pred群では静注されたリン酸プレドニゾロン量は free Pred群の十分の一の $10\text{ }\mu\text{g/injection}$ であったが、IAは free Pred群と同等かそれ以下であった。これはリン酸プレドニゾロンのリポソーム化が薬剤の血中滞留性を向上させたことにより、薬効が向上した可能性があると思われた。L-Pred-SLX群ではリン酸プレドニゾロン量は同様に free Pred群の十分の一の $10\text{ }\mu\text{g/injection}$ であったが、IAは全く上昇せず炎症の進行は有意に抑制された。これは L-Pred と L-Pred-SLX の差、シアリルルイス X 糖鎖の有無によってもたらされた効果と考えられた。つまりシアリルルイス X 糖鎖によってリポソームが効果的に炎症部位へ集積した可能性を示していると思われた。

当 DDS は炎症部位へ極めて有効に治療薬を分配できる能力があることが証明された。これは炎症疾患の治療において病巣部に治療薬を集中させることにより、治療薬の持つ副作用を抑制または治療薬の薬効を増大せしめる可能性が示唆されたものである。

(3) RA マウスを DDS の経口投与により治療する実験

関節炎を起こしているマウスに治療薬を経口投与して治療が施行された。投与

は Day 28 から Day 39 の期間で週 3 回の頻度であった。

Day 28 で炎症所見のあるマウスを選び、それぞれの群の炎症ポイントの平均がほぼ同じになるように 4 群に分けた。それぞれの群は 1) Control : 無治療群、2) free Pred : リン酸プレドニゾロンを生理食塩に溶かした水溶液を使用し、リン酸プレドニゾロンの量が一回 $100 \mu\text{g}$ 、週 $300 \mu\text{g}$ 経口投与した群、3) L-Pred : リン酸プレドニゾロンをリポゾームに包埋、糖鎖を付けないものを使用、リン酸プレドニゾロンの量が一回 $10 \mu\text{g}$ 、週 $30 \mu\text{g}$ 経口投与した群、4) L-Pred-SLX : リン酸プレドニゾロンをリポゾームに包埋、シアリルルイス X 糖鎖を結合させたものを使用、リン酸プレドニゾロンの量が一回 $10 \mu\text{g}$ 、週 $30 \mu\text{g}$ 経口投与した群、の 4 群であった。

この 4 群のマウスの数は Control : 2 匹、free Pred : 3 匹、L-Pred : 3 匹、L-Pred-SLX : 4 匹であった。

以下の結果が得られた。

free Pred 群は feeding needle による胃穿孔で死亡したため Day 32 で実験中止された。Control 群、free Pred 群 (Day 32 まで)、L-Pred 群では IA に有意な差は観られなかった。L-Pred-SLX 群は炎症の進行を抑えることはできなかったが、Day 39 で L-Pred に比して IA は有意に低かった (図 3 3)。

この結果より以下のことが判明した。

Control、free Pred そして L-Pred の 3 群では有意な差がみられていない。これは free Pred 群では経口投与されたリン酸プレドニゾロン $300 \mu\text{g}/\text{week}$ の量が炎症の進行を抑制するのに不十分であったと推測された。また L-Pred 群ではリポゾームが腸管で吸収されなかつたか、吸収されても経口投与されたリン酸プレドニゾロンの量が $30 \mu\text{g}/\text{week}$ であったことを考えると不十分な量であった可能性が高いと思われた。これに対して L-Pred-SLX 群では IA が抑制されていた。これはリポゾームが腸管で吸収され、しかも経口投与リン酸プレドニゾロン量が $30 \mu\text{g}/\text{week}$ であることを考えればリン酸プレドニゾロンが糖鎖付きリポゾームのまま炎症部位へ運ばれた可能性を示唆していると思われた。

この結果は当 DDS が静脈内投与だけでなく、経口投与でも有効に機能することを示している。さらにリポゾームに包埋されれば、従来では経口吸収が不可能な

薬物からでも経口投与可能な製剤がつくれる可能性を示唆するものである。

(4) RAマウス治療においてリン酸プレドニゾロンの適量を求める実験

関節炎を起こしているマウスに治療薬を尾静脈から注射して治療が行われた。

静脈注射は Day 28 から Day 46 の期間で週 2 回の頻度であった。

Day 28 で炎症所見のあるマウスを選び、それぞれの群の炎症ポイントの平均がほぼ同じになるように 3 群に分けた。それぞれの群は 1) Control : 無治療群、2) $250 \mu\text{g}$: リン酸プレドニゾロンを生理食塩に溶かした水溶液を使用、リン酸プレドニゾロンの量が一回 $250 \mu\text{g}$ 、週 $500 \mu\text{g}$ 静脈注射した群、3) $500 \mu\text{g}$: リン酸プレドニゾロンを生理食塩に溶かした水溶液を使用、リン酸プレドニゾロンの量が一回 $500 \mu\text{g}$ 、週 $1000 \mu\text{g}$ 静脈注射した群、の 3 群であった。

この 3 群のマウスの数は Control : 2 匹、 $250 \mu\text{g}$: 2 匹、 $500 \mu\text{g}$: 2 匹であった。

以下の結果が得られた。

Control 群と $250 \mu\text{g}$ 群では有意な差は観られなかった。 $500 \mu\text{g}$ 群では IA の上昇が観られず、炎症の進行は抑制されていた（図 3 4）。

この結果より、以下のことが判明した。当 RA マウスモデルで炎症の進行を抑制するためには最低 $500 \mu\text{g}/\text{week}$ より多く、 $1000 \mu\text{g}/\text{week}$ までのリン酸プレドニゾロン量が要求されることが判明した。静脈注射による治療実験では L-Pred-SLX 群が一回 $10 \mu\text{g}$ 、週 $20 \mu\text{g}$ のリン酸プレドニゾロン量で炎症の進行を抑制したことを考えると、当 DDS では最大 50 分の一の薬物量で従来の治療効果と同様の効果を得ることができる可能性があると考えられた。

これは病巣部での薬剤濃度を維持しながら、全身への投与薬剤量を減らすことが可能で薬剤による副作用を減らすことができるし、また副作用が出現しない濃度まで薬剤の全身投与量を上げれば病巣部の薬剤濃度を上げることができ、さらに高い薬効をえることができる可能性を示している。

実施例 17 2種類の親水性化処理を行ったリポソームの血中滞留性の検討

(1) リポソームの調製

リポソームはコール酸透析法を用いて調製した。すなわち、ジパルミトイulf オスファチジルコリン、コレステロール、ジセチルfosfate、ガングリオ

シド及びジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミンをモル比でそれぞれ 35 : 40 : 5 : 15 : 5 の割合で合計脂質量 45.6mg になるように混合し、コール酸ナトリウム 46.9mg 添加し、クロロホルム／メタノール溶液 3ml に溶解した。この溶液を蒸発させ、沈殿物を真空中で乾燥させることによって脂質膜を得た。得られた脂質膜を TAPS 緩衝液 (pH8.4) 3ml に懸濁、超音波処理し、透明なミセル懸濁液 3ml を得た。このミセル懸濁液に PBS 緩衝液 (pH7.2) を加えて 5ml にしてから、更に TAPS 緩衝液 (pH8.4) で 2250mg/6ml になるよう完全に溶解したリン酸プレドニゾロンを攪拌しながらゆっくりと滴下して均一に混合した後、このリン酸プレドニゾロン入りミセル懸濁液を PM10 膜 (Amicon Co., USA) と TAPS 緩衝液 (pH8.4) を用いた限外濾過にかけ均一なりポソーム 10ml を調製した。得られた生理食塩懸濁液中 (37°C) のリポソーム粒子の粒子径とゼータ電位をゼータ電位・粒子径・分子量測定装置 (Model Nano ZS, Malvern Instruments Ltd., UK) により測定した結果、粒子径は 50～350nm、ゼータ電位は -30～-10mV であった。

(2) リポソーム脂質膜面上の tris(hydroxymethyl)aminomethane による親水性化処理

(1) で調製したリポソーム溶液 10ml を XM300 膜 (Amicon Co., USA) と CBS 緩衝液 (pH 8.5) を用いた限外濾過にかけ溶液の pH を 8.5 にした。次に、架橋試薬 bis(sulfosuccinimidyl) suberate (BS3; Pierce Co., USA) 10ml を加え、25°C で 2 時間攪拌した。その後、更に 7°C で一晩攪拌してリポソーム膜上の脂質ジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミンと BS3 との化学結合反応を完結した。そして、このリポソーム液を XM300 膜と CBS 緩衝液 (pH 8.5) で限外濾過にかけた。次に、CBS 緩衝液 (pH 8.5) 1ml に溶かした tris(hydroxymethyl)aminomethane 40mg をリポソーム液 10ml に加えて、25°C で 2 時間攪拌後、7°C で一晩攪拌してリポソーム膜上の脂質に結合した BS3 と tris(hydroxymethyl)aminomethane との化学結合反応を完結した。これにより、リポソーム膜の脂質ジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミン上に tris(hydroxymethyl)aminomethane の水酸基が配位して水和親水性化された。

(3) リポソーム脂質膜面上のセロビオースによる親水性化処理

(1) で調製したリポソーム溶液 10ml を XM300 膜 (Amicon Co., USA) と CBS

緩衝液 (pH 8.5) を用いた限外濾過にかけ溶液の pH を 8.5 にした。次に、架橋試薬 bis(sulfosuccinimidyl) suberate (BS3; Pierce Co., USA) 10ml を加え、25°Cで2時間攪拌した。その後、更に 7°Cで一晩攪拌してリポソーム膜上の脂質ジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミンと BS3 との化学結合反応を完結した。そして、このリポソーム液を XM300 膜と CBS 緩衝液 (pH 8.5) で限外濾過にかけた。次に、CBS 緩衝液 (pH 8.5) 1ml に溶かしたセロビオース 50mg をリポソーム液 10ml に加えて、25°Cで2時間攪拌後、7°Cで一晩攪拌してリポソーム膜上の脂質に結合した BS3 とセロビオースとの化学結合反応を完結した。これにより、リポソーム膜の脂質ジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミン上にセロビオースの水酸基が配位して水和親水性化された。

(4) tris(hydroxymethyl) aminomethane 結合リポソーム膜面上へのヒト血清アルブミン (HSA) の結合

既報の手法 (Yamazaki, N., Kodama, M. and Gabius, H.-J. (1994) Methods Enzymol. 242, 56-65) により、カップリング反応法を用いて行った。すなわち、この反応は2段階化学反応で行い、まずははじめに、(2)で得られた 10ml のリポソーム膜面上に存在するガングリオシドを 1ml の TAPS 緩衝液 (pH 8.4) に溶かしたメタ過ヨウ素酸ナトリウム 43mg を加えて室温で2時間攪拌して過ヨウ素酸酸化した後、XM300 膜と PBS 緩衝液 (pH 8.0) で限外濾過することにより酸化されたりポソーム 10ml を得た。このリポソーム液に、20mg のヒト血清アルブミン (HSA) を加えて 25°Cで2時間攪拌し、次に PBS (pH 8.0) に 2M NaBH₃CN 100 μl を加えて 10°Cで一晩攪拌してリポソーム上のガングリオシドと HSA とのカップリング反応で HSA を結合した。そして、XM300 膜と CBS 緩衝液 (pH 8.5) で限外濾過をした後、HSA 結合リポソーム液 10ml を得た。

(5) セロビオース結合リポソーム膜面上へのヒト血清アルブミン (HSA) の結合

既報の手法 (Yamazaki, N., Kodama, M. and Gabius, H.-J. (1994) Methods Enzymol. 242, 56-65) により、カップリング反応法を用いて行った。すなわち、この反応は2段階化学反応で行い、まずははじめに、実施例3で得られた 10ml のリポソーム膜面上に存在するガングリオシドを 1ml の TAPS 緩衝液 (pH 8.4) に溶かし

たメタ過ヨウ素酸ナトリウム 43mg を加えて室温で 2 時間攪拌して過ヨウ素酸酸化した後、 XM300 膜と PBS 緩衝液 (pH 8.0) で限外濾過することにより酸化されたりポソーム 10ml を得た。このリポソーム液に、 20mg のヒト血清アルブミン (HSA) を加えて 25°C で 2 時間攪拌し、 次に PBS (pH 8.0) に 2M NaBH₃CN 100 μl を加えて 10°C で一晩攪拌してリポソーム上のガングリオシドと HSA とのカップリング反応で HSA を結合した。そして、 XM300 膜と CBS 緩衝液 (pH 8.5) で限外濾過をした後、 HSA 結合リポソーム液 10ml を得た。

(6) リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン (HSA) 上への tris (hydroxymethyl) aminomethane の結合によるリンカー蛋白質 (HSA) の親水性化処理

親水性化試料の一つとしてのリポソームを調製するために、(4) で得たりポソーム液の一部分 1ml に架橋試薬 3, 3'-dithiobis (sulfosuccinimidyl) propionate (DTSSP; Pierce Co., USA) 1mg を加えて 25°C で 2 時間、 続いて 7°C で一晩攪拌し、 XM300 膜と CBS 緩衝液 (pH 8.5) で限外濾過して DTSSP がリポソーム上の HSA に結合したリンカー蛋白質 (HSA) の親水性化処理リポソーム 1ml を得た。次に、このリポソーム液に tris (hydroxymethyl) aminomethane (Wako Co., Japan) 13mg を加えて、 25°C で 2 時間攪拌し、その後 7°C で一晩攪拌し、 XM300 膜と PBS 緩衝液 (pH 7.2) で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上の DTSSP に tris (hydroxymethyl) aminomethane の結合を行った。その結果、 tris (hydroxymethyl) aminomethane とヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したリンカー蛋白質 (HSA) の親水性化処理をした比較試料としてのリポソーム 2ml (総脂質量 2mg、 総蛋白量 200 μg) が得られた。得られた生理食塩懸濁液中 (37°C) のリポソーム粒子の粒子径とゼータ電位をゼータ電位・粒子径・分子量測定装置 (Model Nano ZS, Malvern Instruments Ltd., UK) により測定した結果、 粒子径は 50~350nm、 ゼータ電位は -30~-10mV であった。

(7) リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン (HSA) 上へのセロビオースの結合によるリンカー蛋白質 (HSA) の親水性化処理

親水性化試料の一つとしてのリポソームを調製するために、(5) で得たりポソーム液の一部分 1ml に架橋試薬 3, 3'-dithiobis (sulfosuccinimidyl) propionate

(DTSSP; Pierce Co., USA) 1mg を加えて 25°Cで 2 時間、続いて 7°Cで一晩攪拌し、XM300 膜と CBS 緩衝液 (pH 8.5) で限外濾過して DTSSP がリポソーム上の HSA に結合したリンカー蛋白質 (HSA) の親水性化処理リポソーム 1ml を得た。次に、このリポソーム液セロビオース 30mg を加えて、25°Cで 2 時間攪拌し、その後 7°Cで一晩攪拌し、XM300 膜と PBS 緩衝液 (pH 7.2) で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上の DTSSP にセロビオースの結合を行った。その結果、セロビオースとヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したリンカー蛋白質 (HSA) の親水性化処理をした親水性化試料の一つとしてのリポソーム 2ml (総脂質量 2mg、総蛋白量 200 μg) が得られた。得られた生理食塩懸濁液中 (37°C) のリポソーム粒子の粒子径とゼータ電位をゼータ電位・粒子径・分子量測定装置 (Model Nano ZS, Malvern Instruments Ltd., UK) により測定した結果、粒子径は 50~350nm、ゼータ電位は -30~-10mV であった。

(8) 親水性化処理をしてないリポソームの調製

リポソームはコール酸透析法を用いて調製した。すなわち、ジパルミトイルフォスファチジルコリン、コレステロール、ジセチルfosfate、ガングリオシド (糖脂質糖鎖として GT1b を 100% 含むもの) をモル比でそれぞれ 35 : 45 : 5 : 15 の割合で合計脂質量 45.6mg になるように混合し、コール酸ナトリウム 46.9mg 添加し、クロロホルム／メタノール溶液 3ml に溶解した。この溶液を蒸発させ、沈殿物を真空中で乾燥させることによって脂質膜を得た。得られた脂質膜を TAPS 緩衝液 (pH8.4) 3ml に懸濁、超音波処理し、透明なミセル懸濁液 3ml を得た。このミセル懸濁液に PBS 緩衝液 (pH7.2) を加えて 10ml にしてから、更に TAPS 緩衝液 (pH8.4) で 3mg/1ml になるよう完全に溶解したドキソルビシンを攪拌しながらゆっくりと滴下して均一に混合した後、このドキソルビシン入りミセル懸濁液を PM10 膜 (AmiconCo., USA) と TAPS 緩衝液 (pH8.4) を用いた限外濾過にかけ均一な親水性化処理をしてないリポソーム粒子懸濁液 10ml を調製した。得られた生理食塩懸濁液中 (37°C) の親水性化処理をしてないリポソーム粒子の粒子径とゼータ電位をゼータ電位・粒子径・分子量測定装置 (Model Nano ZS, Malvern Instruments Ltd., UK) により測定した結果、粒子径は 50~350nm、ゼータ電位は -30~-10mV であった。

(9) クロラミン T 法によるリポソームの ^{125}I 標識

クロラミン T (Wako Pure Chemical Co., Japan) 溶液並びに二亜硫酸ナトリウム溶液をそれぞれ 3mg/ml 並びに 5mg/ml となるように用事調製して用いた。実施例 6 から 8 において調製した 3 種のリポソームとを 50 μl ずつ別々にエッペンチューブに入れ、続いて $^{125}\text{I-NaI}$ (NEN Life Science Product, Inc. USA) を 15 μl 、クロラミン T 溶液を 10 μl 加え反応させた。5 分ごとにクロラミン T 溶液 10 μl を加え、この操作を 2 回繰り返した後 15 分後に還元剤として二亜硫酸ナトリウム 100 μl 加え、反応を停止させた。次に、Sephadex G-50 (Phramacia Biotech. Sweden) カラムクロマト上に乗せ、PBS で溶出、標識体を精製した。最後に、非標識-リポソーム複合体を添加して比活性 ($4 \times 10^6 \text{ Bq/mg protein}$) を調整して 3 種類の ^{125}I 標識リポソーム液を得た。

(10) 各種のリポソームの担癌マウスでの血中濃度の測定

Ehrlich ascites tumor (EAT) 細胞 (約 2×10^7 個) を雄性 ddY マウス (7 週齢) 大腿部皮下に移植し、癌組織が 0.3~0.6g に発育 (6~8 日後) したものを使いた。この担癌マウスに (9) により ^{125}I 標識した 3 種のリポソーム複合体 0.2ml を脂質量として 30 μg /一匹の割合となるように尾静脈に注入投与し、5 分後に血液を採取し、その放射能をガンマカウンタ (Aloka ARC 300) で測定した。なお、血液への放射能分布量は、投与全放射能に対する血液 1ml 当たりの放射能の割合 (% 投与量 / ml 血液) で表示した。図 35 に示すとおり、2 種類の親水性化処理により血中滞留性が向上するが、とりわけトリス (ヒドロキシメチル) アミノメタンにより親水性化処理をしたリポソームの血中滞留性の向上が顕著であった。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

産業上の利用の可能性

本発明の炎症性疾患治療用標的指向性リポソームは、炎症性疾患部位に特異的に取り込まれ、リポソームに封入された炎症性疾患治療薬剤を放出する。本発明のリポソームは炎症性疾患に対するドラッグデリバリーシステムのための治療用

または診断用薬剤としての効果を有する。

本発明のシリカルルイスX糖鎖等の糖鎖を結合したリポソームは、E, P-セレクチンを発現する病変部位に特異的に到達し、該部位で医薬効果を有する薬剤を放出するので、炎症性疾患治療用または診断用製剤として利用可能である。

実施例に示すように、本発明の炎症性疾患治療用標的指向性リポソームに抗炎症薬を封入して投与した場合、抗炎症薬を単独投与した場合に比較して、数十倍から数百倍の薬剤が炎症部位に集積し著しい効果を発揮することができる。

請求の範囲

1. 糖鎖がリポソーム膜に結合されている糖鎖修飾リポソームを含む炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。
2. リポソームの構成脂質が、フォスファチジルコリン類(モル比0～70%)、フォスファチジルエタノールアミン類(モル比0～30%)、フォスファチジン酸類、長鎖アルキルリン酸塩類およびジセチルリン酸類からなる群から選択される1種以上の脂質(モル比0～30%)、ガングリオシド類、糖脂質類、フォスファチジルグリセロール類およびスフィンゴミエリン類からなる群から選択される1種以上の脂質(モル比0～40%)、ならびにコレステロール類(モル比0～70%)を含む、請求項1記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。
3. ガングリオシド類、糖脂質類、フォスファチジルグリセロール類、スフィンゴミエリン類およびコレステロール類からなる群から選択される少なくとも1種の脂質がリポソーム表面上で集合しラフトを形成している請求項2記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。
4. 糖鎖の種類および密度が制御されて結合されている、請求項1から3のいずれか1項に記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。
5. リポソームの粒径が30～500nmである、請求項1から4のいずれか1項に記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。
6. リポソームの粒径が50～300nmである、請求項5記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。
7. リポソームのゼータ電位が-50～10mVである、請求項1から6のいずれか1項記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。
8. リポソームのゼータ電位が-40～0mVである、請求項7記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。
9. リポソームのゼータ電位が-30～-10mVである、請求項8記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。
10. 糖鎖がリンカー蛋白質を介してリポソーム膜に結合されている、請求項1から9のいずれか1項に記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

11. リンカ一蛋白質が生体由来蛋白質である請求項10記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

12. リンカ一蛋白質がヒト由来蛋白質である請求項11記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

13. リンカ一蛋白質がヒト由来血清蛋白質である請求項12記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

14. リンカ一蛋白質がヒト血清アルブミンまたはウシ血清アルブミンである請求項10記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

15. リンカ一蛋白質がリポソーム表面上に形成されているガングリオシド類、糖脂質類、フォスファチジルグリセロール類、スフィンゴミエリン類およびコレステロール類からなる群から選択される少なくとも1種の脂質からなるラフト上に結合している請求項1から14のいずれか1項に記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

16. リポソーム膜および／またはリンカ一蛋白質に親水性化合物が結合することにより親水性化されている、請求項1から15のいずれか1項に記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

17. 親水性化合物が低分子物質である、請求項16記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

18. 親水性化合物が糖鎖に対する立体障害となりにくく標的細胞膜面上のレクチンによる糖鎖分子認識反応の進行を妨げない、請求項16または17記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

19. 親水性化合物が水酸基を有する請求項16から18のいずれか1項に記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

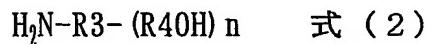
20. 親水性化合物がアミノアルコール類である請求項16から19のいずれか1項に記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

21. 親水性化合物がリポソーム膜表面に直接結合している請求項16から20のいずれか1項に記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

22. 親水性化合物により親水性化され、該親水性化合物が、一般式(1)
X-R₁(R₂OH)_n 式(1)

で示される請求項 1 6 記載の糖鎖修飾リポソームであって、R1 は、C1 から C40 の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、R2 は存在しないかもしくは C1 から C40 の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、X はリポソーム脂質またはリンカー蛋白質と直接または架橋用の二価試薬と結合する反応性官能基を示し、n は自然数を示す、炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

23. 親水性化合物により親水性化され、該親水性化合物が、一般式 (2)



で示される請求項 1 6 記載の糖鎖修飾リポソームであって、R3 は、C1 から C40 の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、R4 は存在しないかもしくは C1 から C40 の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、H₂N はリポソーム脂質またはリンカー蛋白質と直接または架橋用の二価試薬と結合する反応性官能基を示し、n は自然数を示す、炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

24. 親水性化合物により親水性化され、該親水性化合物が、一般式 (3)



で示される請求項 1 6 記載の糖鎖修飾リポソームであって、R5 は、C1 から C40 の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、H₂N はリポソーム脂質またはリンカー蛋白質と直接または架橋用の二価試薬と結合する反応性官能基を示し、n は自然数を示す、炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

25. リポソーム膜および／またはリンカー蛋白質にトリス（ヒドロキシアルキル）アミノアルカンである親水性化合物を共有結合により結合させることによりリポソーム膜および／またはリンカー蛋白質が親水性化されている、請求項 1 6 記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

26. リポソーム膜および／またはリンカー蛋白質にトリス（ヒドロキシメチル）アミノエタン、トリス（ヒドロキシエチル）アミノエタン、トリス（ヒドロキシプロピル）アミノエタン、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン、トリス（ヒドロキシエチル）アミノメタン、トリス（ヒドロキシプロピル）アミノメタン、トリス（ヒドロキシメチル）アミノプロパン、トリス（ヒドロキシエチル）アミノプロパン、トリス（ヒドロキシプロピル）アミノプロパンからなる群から選択される親水性化合物を共有結合により結合させることによりリポソーム

膜および／またはリンカー蛋白質が親水性化されている、請求項 1 6 記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

27. 糖鎖修飾リポソームが、各組織の細胞膜面上に存在するレセプターとしてのセレクチン、DC-SIGN、DC-SGNR、コレクチンおよびマンノース結合レクチンを含む C-タイプレクチン、シグレックを含む I タイプレクチン、マンノース-6-リン酸受容体を含む P タイプレクチン、R タイプレクチン、L タイプレクチン、M タイプレクチン、ガレクチンからなる群から選択されるレクチンを標的とする請求項 1 から 26 のいずれか 1 項に記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

28. 糖鎖修飾リポソームが E-セレクチン、P-セレクチンおよび L-セレクチンからなる群から選択されるセレクチンを標的とする請求項 27 記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

29. リポソームに結合した糖鎖の結合密度が、リポソームに結合させるリンカ一蛋白質 1 分子当り 1 ~ 60 個である、請求項 1 から 28 のいずれか 1 項に記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

30. リポソームに結合した糖鎖の結合密度が、リンカ一蛋白質を用いる場合は、リポソーム 1 粒子当り 1 ~ 30000 個であり、リンカ一蛋白質を用いない場合は、リポソーム 1 粒子当り最高 1 ~ 500000 個である、請求項 1 から 28 のいずれか 1 項に記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

31. 糖鎖がルイス X 型三糖鎖、シアリルルイス X 型四糖鎖、3' -シアリルラクトサミン三糖鎖、6' -シアリルラクトサミン三糖鎖、アルファ 1, 2 マンノビオース二糖鎖、アルファ 1, 3 マンノビオース二糖鎖、アルファ 1, 4 マンノビオース二糖鎖、アルファ 1, 6 マンノビオース二糖鎖、アルファ 1, 3 アルファ 1, 6 マンノトリオース三糖鎖、オリゴマンノース 3 五糖鎖、オリゴマンノース 4 b 六糖鎖、オリゴマンノース 5 七糖鎖、オリゴマンノース 6 八糖鎖、オリゴマンノース 7 九糖鎖、オリゴマンノース 8 十糖鎖、オリゴマンノース 9 十一糖鎖、ラクトース二糖鎖、2' -フコシルラクトース三糖鎖、ジフコシルラクトース四糖類、3-フコシルラクトース三糖鎖、3' -シアリルラクトース三糖鎖および 6' -シアリルラクトース三糖鎖からなる群から選択される、請求項 1 から 30 のいずれか 1 項に記載の

炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

3 2. 糖鎖修飾リポソームが含む薬剤が、副腎皮質ホルモン、抗炎症薬、免疫抑制剤、抗がん剤、抗菌薬、抗ウイルス薬、血管新生抑制剤、サイトカインやケモカイン、抗サイトカイン抗体や抗ケモカイン抗体、抗サイトカイン・ケモカイン受容体抗体、siRNA や DNA などの遺伝子治療関連の核酸製剤、神経保護因子および抗体医薬からなる群から選択される請求項 1 から 3 1 のいずれか 1 項に記載の炎症性疾患治療用医薬組成物。

3 3. 糖鎖修飾リポソームが含む薬剤が、副腎皮質ホルモンまたは抗炎症薬である請求項 3 2 記載の炎症性疾患治療用医薬組成物。

3 4. 糖鎖修飾リポソームが含む薬剤がプレドニゾロンである請求項 3 3 記載の炎症性疾患治療用医薬組成物。

3 5. 薬剤が、薬剤を単独投与した場合に比べ、炎症部位に 10 倍以上多く集積し得る、請求項 3 2 から 3 4 のいずれか 1 項に記載の炎症性疾患治療用医薬組成物。

3 6. 炎症性疾患が脳炎、炎症性眼疾患、耳炎、咽頭炎、肺炎、胃炎、腸炎、肝炎、脾炎、腎炎、膀胱炎、尿道炎、子宮体炎、膿炎、関節炎、末梢神経炎、悪性腫瘍、感染性疾患、リウマチ、全身性エリテマトーデス、サルコイドーシスなどの自己免疫疾患、心筋梗塞、脳梗塞などの虚血性疾患、糖尿病、痛風などの代謝性疾患、外傷・熱傷・化学腐食、アルツハイマー病などの神経変性疾患からなる群から選択される、請求項 1 から 3 5 のいずれか 1 項に記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

3 7. 炎症性疾患が炎症性眼疾患である請求項 3 6 記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

3 8. 炎症性疾患がリウマチである請求項 3 6 記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

3 9. 炎症性疾患が腸炎である請求項 3 6 記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

4 0. 経口投与用医薬組成物である、請求項 1 から 3 9 のいずれか 1 項に記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

4 1. 非経口投与用医薬組成物である、請求項 1 から 3 9 のいずれか 1 項に記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

4 2. リポソーム膜が親水性化されており、表面に糖鎖が結合していないリポソームを含む炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

4 3. リポソームの構成脂質が、フォスファチジルコリン類(モル比 0 ~ 70%)、フォスファチジルエタノールアミン類(モル比 0 ~ 30%)、フォスファチジン酸類、長鎖アルキルリン酸塩類およびジセチルリン酸類からなる群から選択される 1 種以上の脂質(モル比 0 ~ 30%)、ガングリオシド類、糖脂質類、フォスファチジルグリセロール類およびスフィンゴミエリン類からなる群から選択される 1 種以上の脂質(モル比 0 ~ 40%)、ならびにコレステロール類(モル比 0 ~ 70%)を含む、請求項 4 2 記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

4 4. リポソームが、さらに蛋白質を含む請求項 4 3 記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

4 5. リポソーム膜および／またはリンカー蛋白質に親水性化合物が結合することにより親水性化されている、請求項 4 2 から 4 4 のいずれか 1 項に記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

4 6. 親水性化合物が低分子物質である、請求項 4 5 記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

4 7. 親水性化合物が水酸基を有する請求項 4 5 または 4 6 に記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

4 8. 親水性化合物がアミノアルコール類である請求項 4 5 から 4 7 のいずれか 1 項に記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

4 9. 親水性化合物がリポソーム膜表面に直接結合している請求項 4 5 から 4 8 のいずれか 1 項に記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

5 0. 親水性化合物により親水性化され、該親水性化合物が、一般式 (1)
X-R₁(R₂OH)_n 式 (1)

で示される請求項 4 5 記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物であって、R₁ は、C₁ から C₄₀ の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、R₂ は存在しないかもしくは C₁ から C₄₀ の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、X はリポソーム脂

質またはリンカー蛋白質と直接または架橋用の二価試薬と結合する反応性官能基を示し、nは自然数を示す、炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

5 1. 親水性化合物により親水性化され、該親水性化合物が、一般式（2）
 $H_2N-R3-(R4OH)_n$ 式（2）

で示される請求項4 5記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物であって、R3は、C1からC40の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、R4は存在しないかもしくはC1からC40の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、H₂Nはリポソーム脂質またはリンカー蛋白質と直接または架橋用の二価試薬と結合する反応性官能基を示し、nは自然数を示す、炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

5 2. 親水性化合物により親水性化され、該親水性化合物が、一般式（3）
 $H_2N-R5(OH)_n$ 式（3）

で示される請求項4 5記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物であって、R5は、C1からC40の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、H₂Nはリポソーム脂質またはリンカー蛋白質と直接または架橋用の二価試薬と結合する反応性官能基を示し、nは自然数を示す、炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

5 3. リポソーム膜および／またはリンカー蛋白質にトリス（ヒドロキシアルキル）アミノアルカンである親水性化合物を共有結合により結合させることによりリポソーム膜および／またはリンカー蛋白質が親水性化されている、請求項4 5記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

5 4. リポソーム膜および／またはリンカー蛋白質にトリス（ヒドロキシメチル）アミノエタン、トリス（ヒドロキシエチル）アミノエタン、トリス（ヒドロキシプロピル）アミノエタン、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン、トリス（ヒドロキシエチル）アミノメタン、トリス（ヒドロキシプロピル）アミノメタン、トリス（ヒドロキシメチル）アミノプロパン、トリス（ヒドロキシエチル）アミノプロパン、トリス（ヒドロキシプロピル）アミノプロパンからなる群から選択される親水性化合物を共有結合により結合させることによりリポソーム膜および／またはリンカー蛋白質が親水性化されている、請求項5 3記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

5 5. リポソームが含む薬剤が、副腎皮質ホルモン、抗炎症薬、免疫抑制剤、

抗がん剤、抗菌薬、抗ウイルス薬、血管新生抑制剤、サイトカインやケモカイン、抗サイトカイン抗体や抗ケモカイン抗体、抗サイトカイン・ケモカイン受容体抗体、siRNA や DNA などの遺伝子治療関連の核酸製剤、神経保護因子および抗体医薬からなる群から選択される請求項 4 2 から 5 4 のいずれか 1 項に記載の炎症性疾患治療用医薬組成物。

5 6. リポソームが含む薬剤が、副腎皮質ホルモンまたは抗炎症薬である請求項 5 5 記載の炎症性疾患治療用医薬組成物。

5 7. リポソームが含む薬剤がプレドニゾロンである請求項 5 6 記載の炎症性疾患治療用医薬組成物。

5 8. 薬剤が、薬剤を単独投与した場合に比べ、炎症部位に 10 倍以上多く集積し得る、請求項 5 5 から 5 7 のいずれか 1 項に記載の炎症性疾患治療用医薬組成物。

5 9. 炎症性疾患が脳炎、炎症性眼疾患、耳炎、咽頭炎、肺炎、胃炎、腸炎、肝炎、脾炎、腎炎、膀胱炎、尿道炎、子宮体炎、膿炎、関節炎、末梢神経炎、悪性腫瘍、感染性疾患、リウマチ、全身性エリテマトーデス、サルコイドーシスなどの自己免疫疾患、心筋梗塞、脳梗塞などの虚血性疾患、糖尿病、痛風などの代謝性疾患、外傷・熱傷・化学腐食、アルツハイマー病などの神経変性疾患からなる群から選択される、請求項 4 2 から 5 8 のいずれか 1 項に記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

6 0. 炎症性疾患が炎症性眼疾患である請求項 5 9 記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

6 1. 炎症性疾患がリウマチである請求項 5 9 記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

6 2. 炎症性疾患が腸炎である請求項 5 9 記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

6 3. 経口投与用医薬組成物である、請求項 4 2 から 6 2 のいずれか 1 項に記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

6 4. 非経口投与用医薬組成物である、請求項 4 2 から 6 2 のいずれか 1 項に記載の炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物。

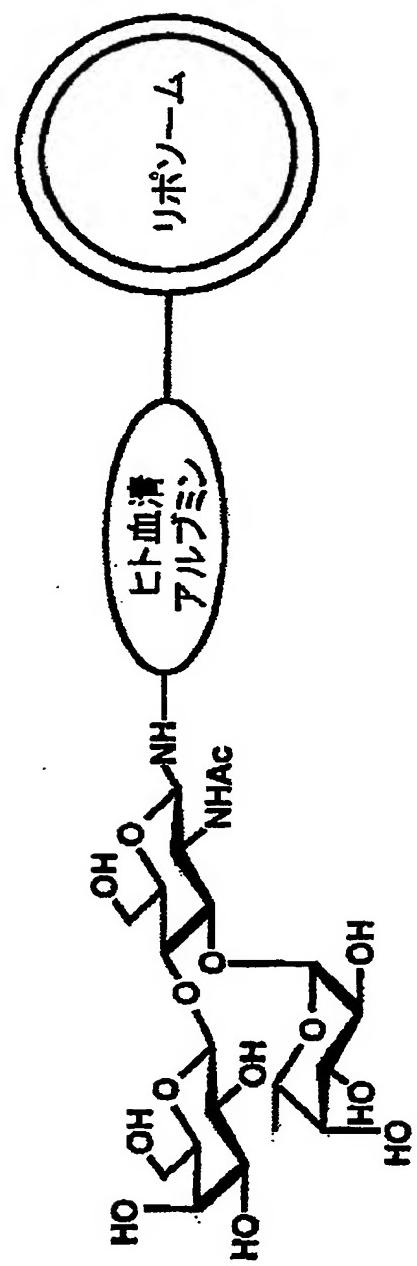
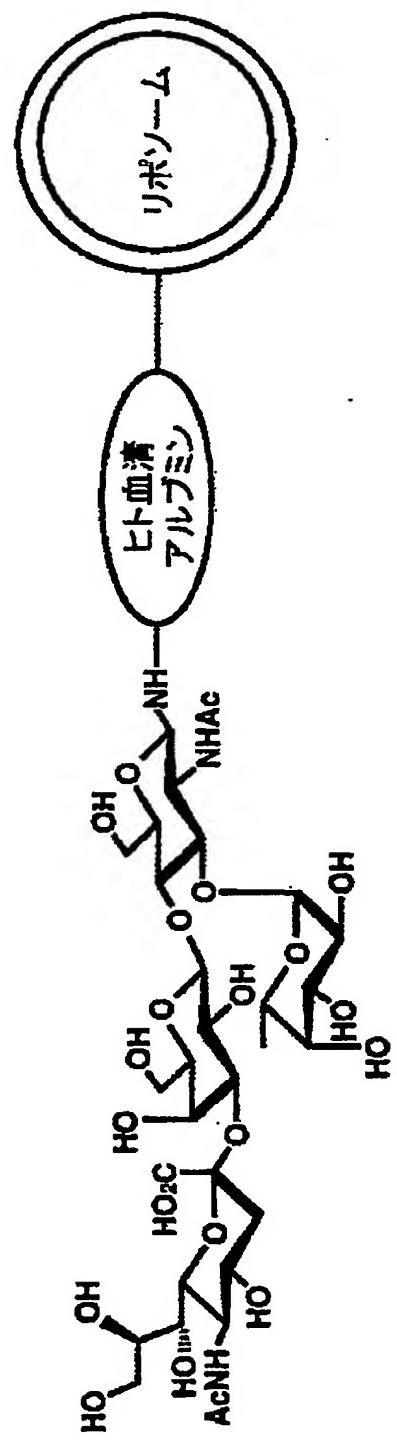


図 1



2

図 3

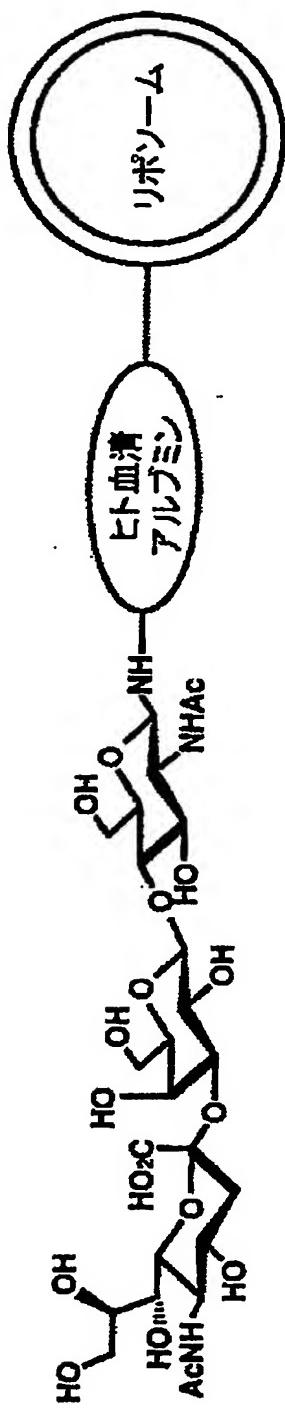
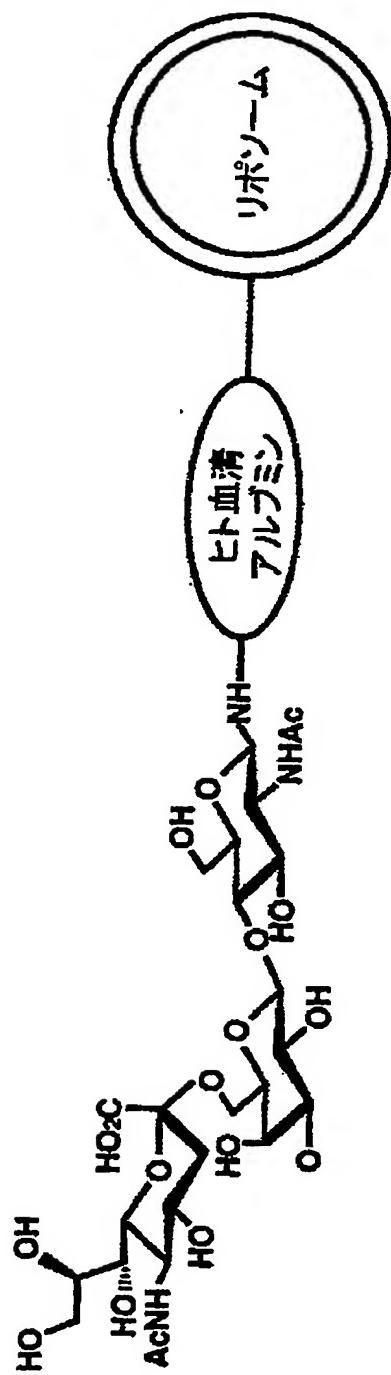


図4



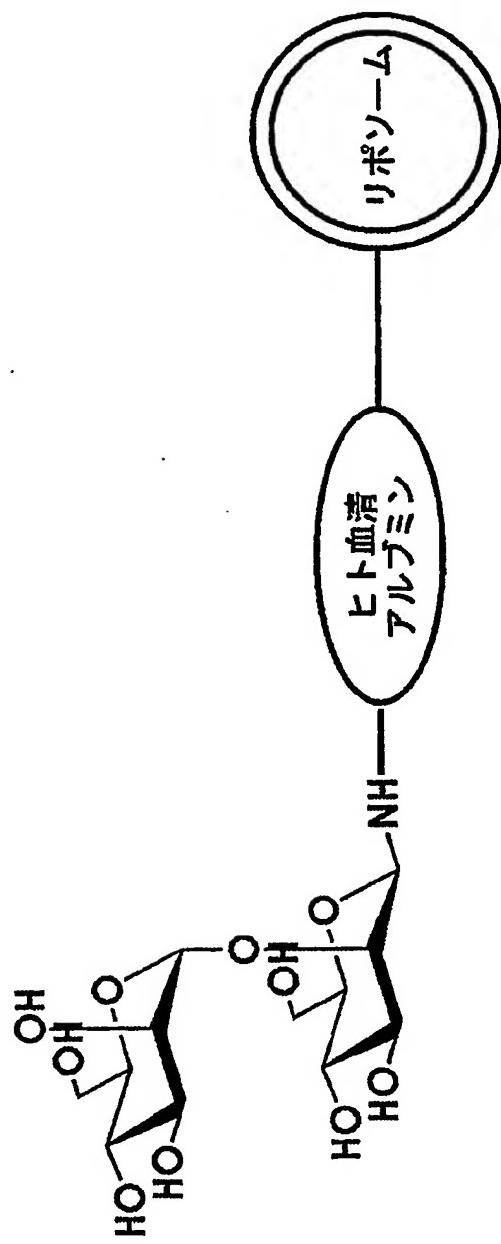


図 5

図 6

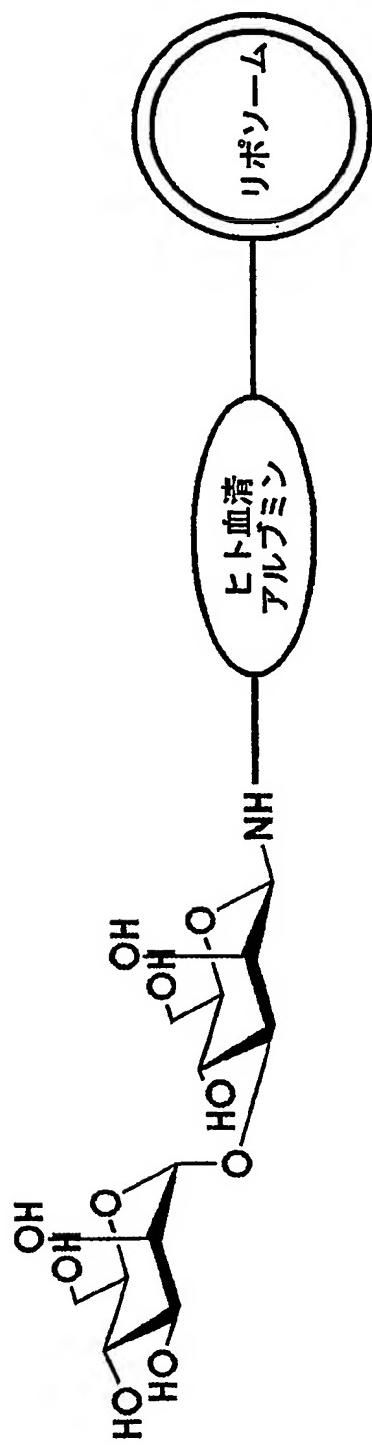


図 7

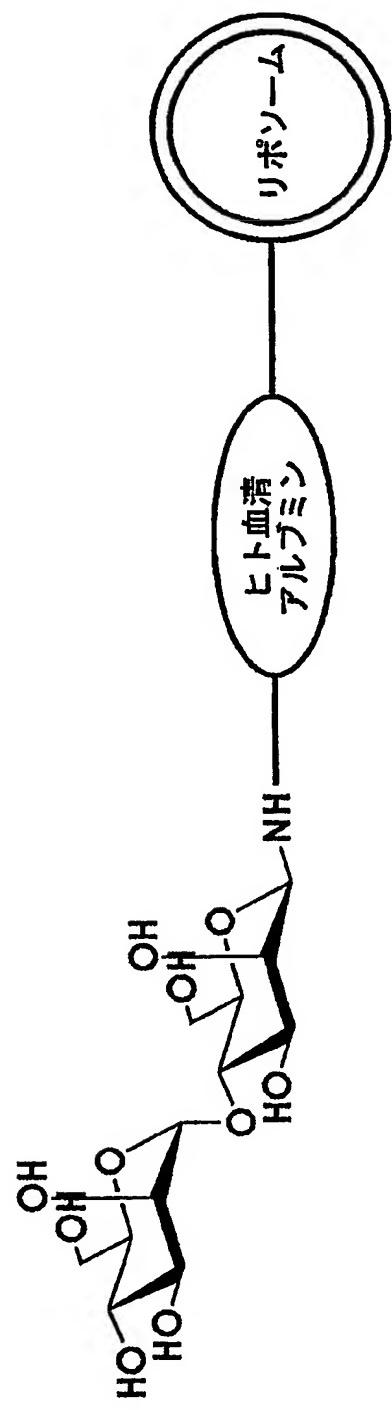


図 8

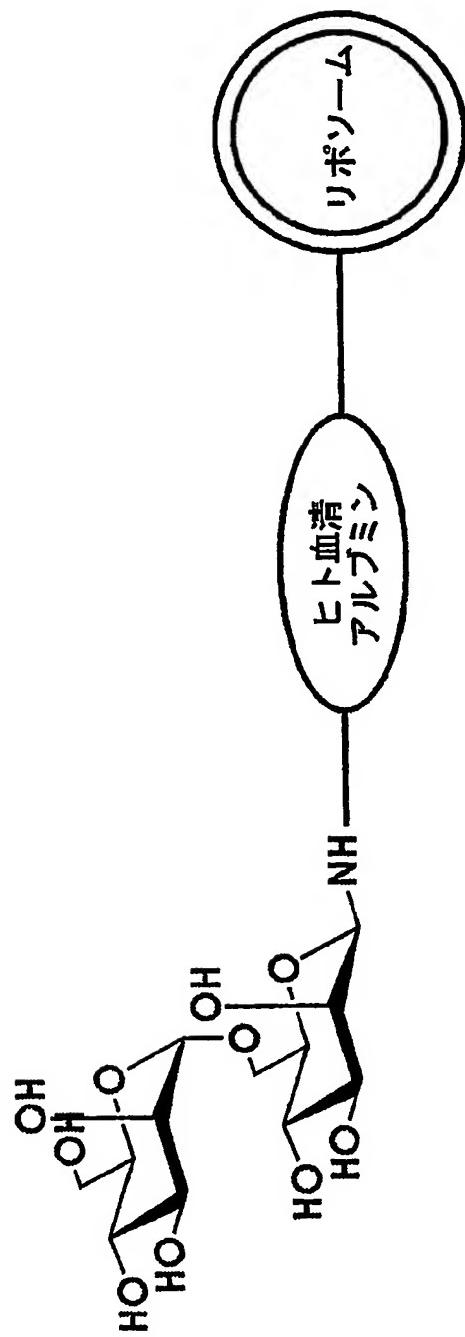


図 9

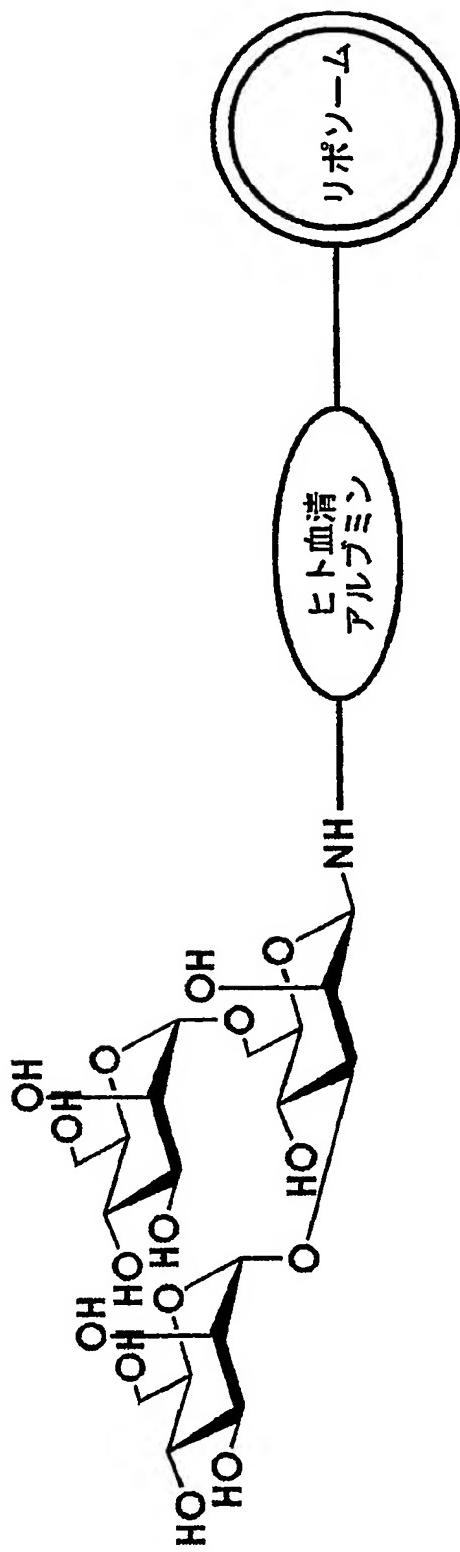


図10

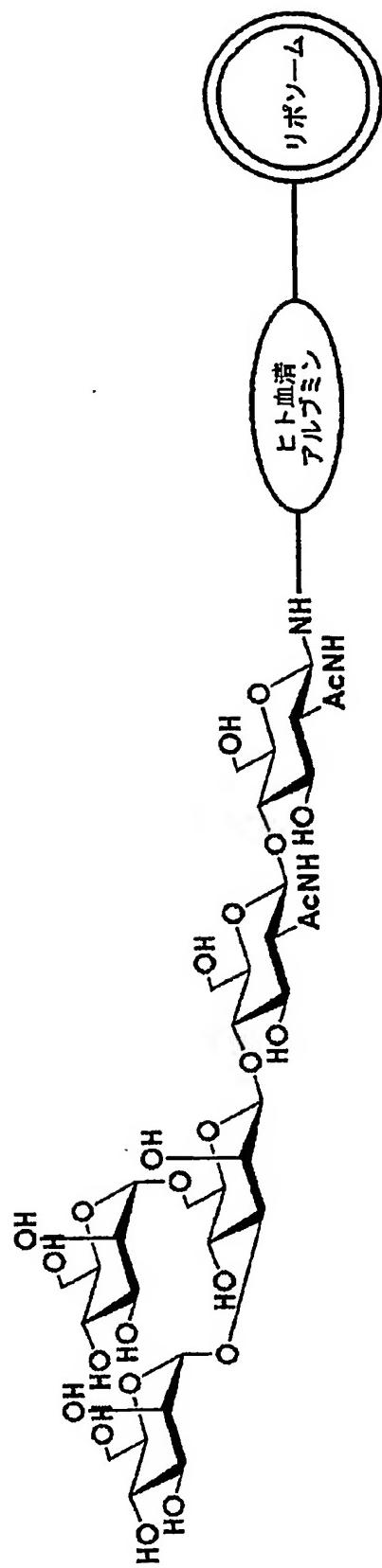


図 11

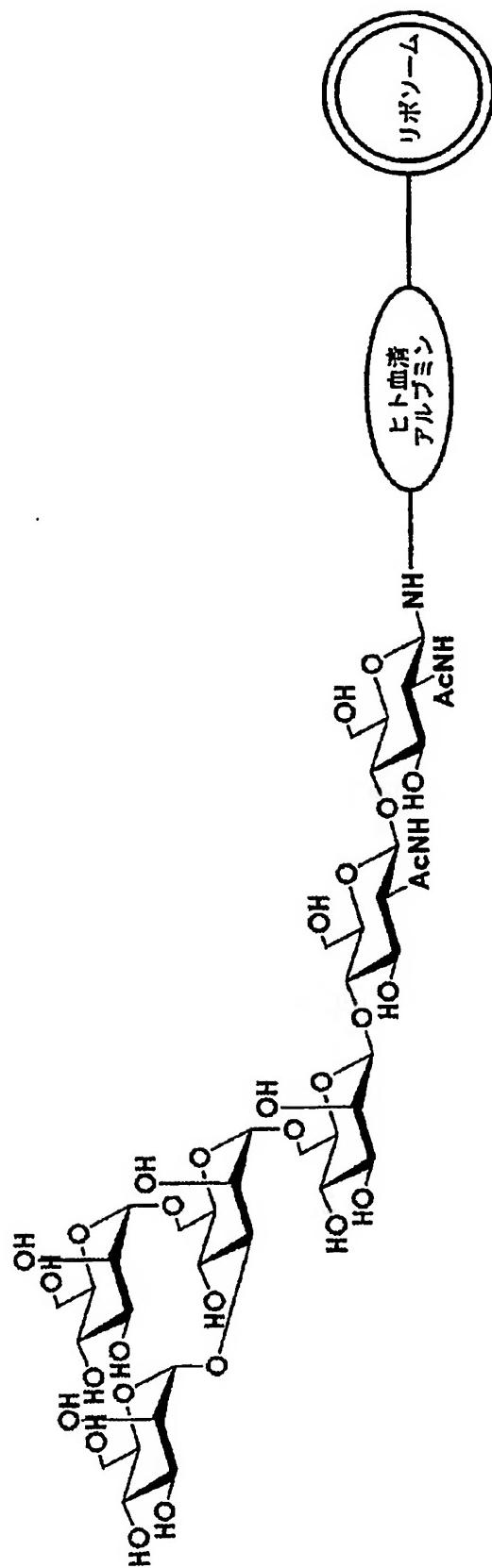


図 12

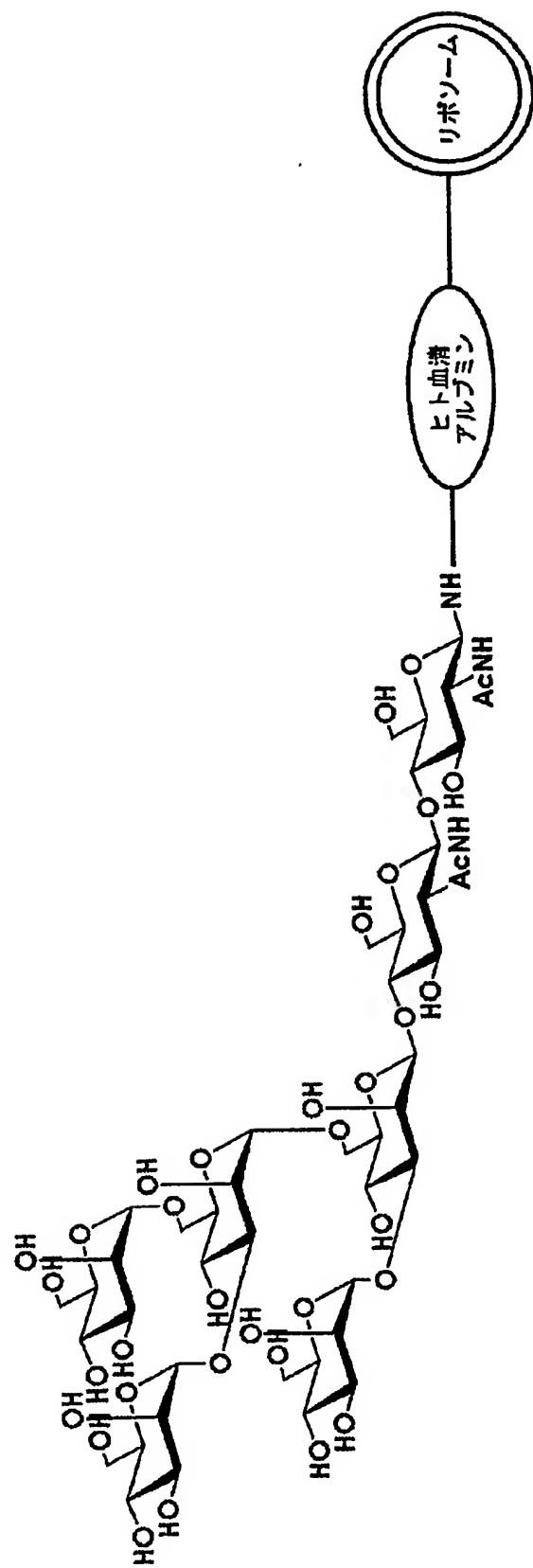


図 13

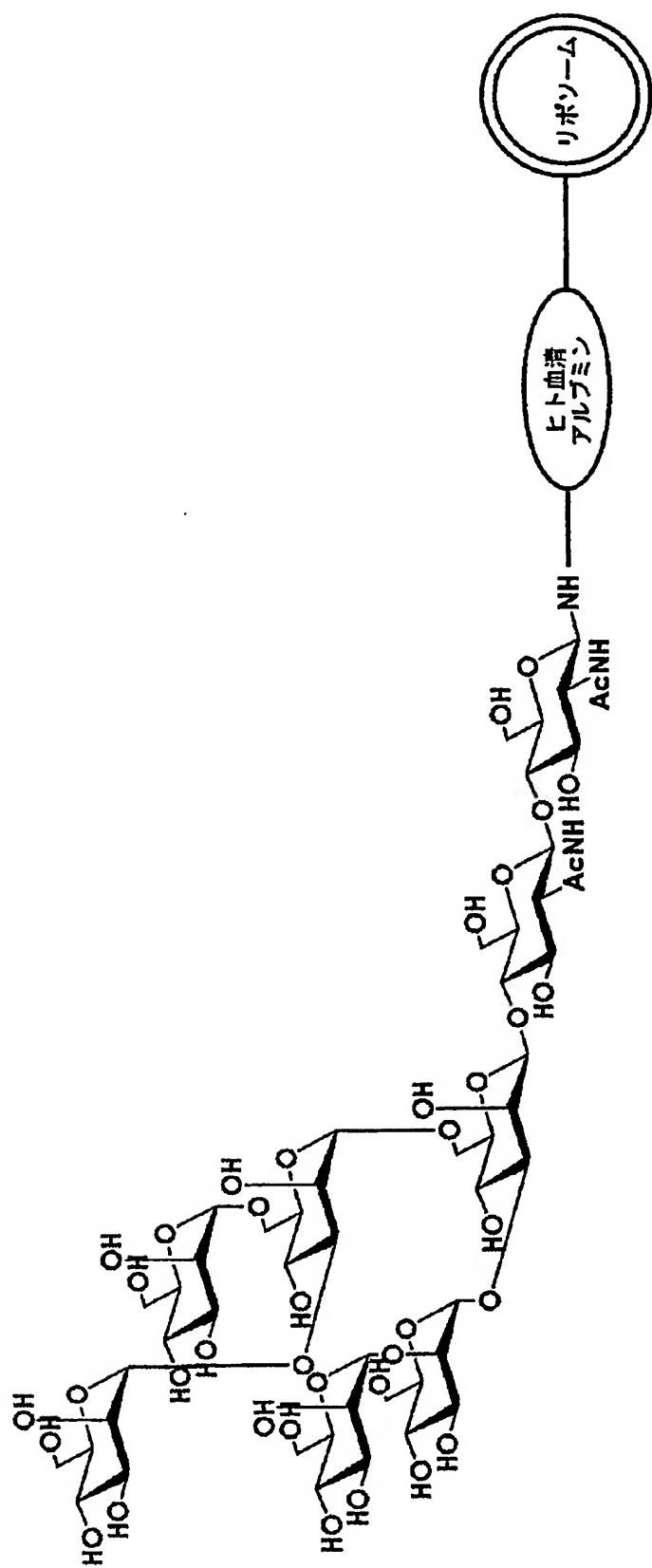


図 14

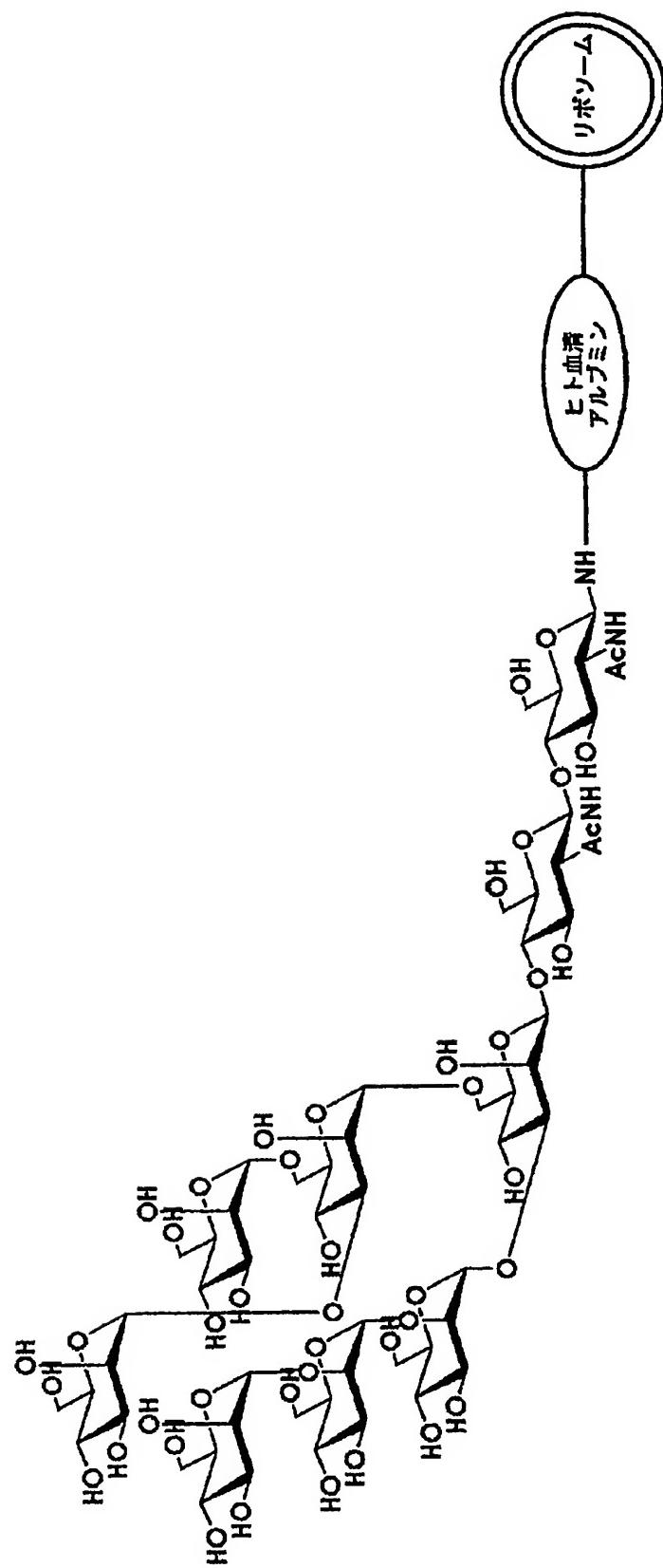


図 15

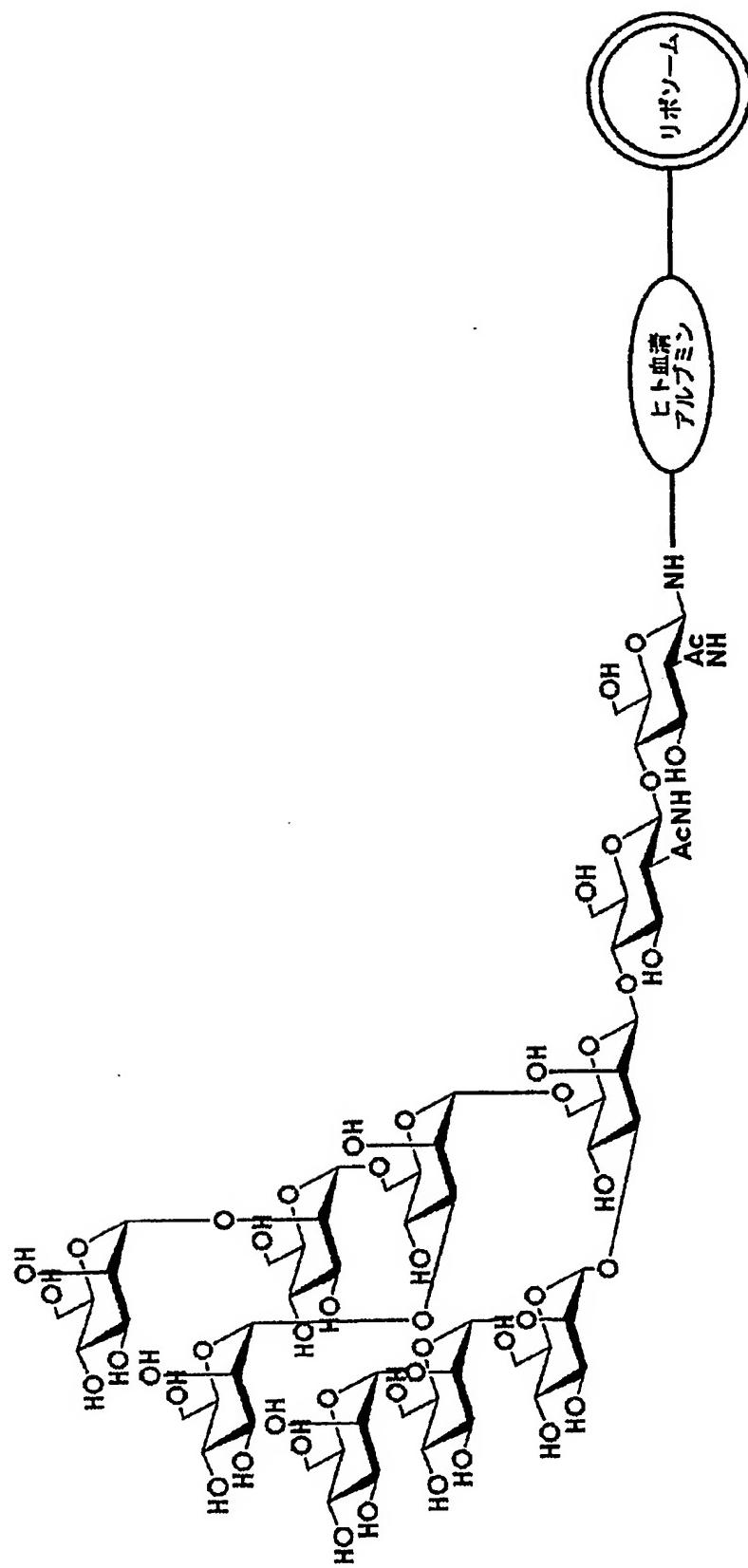


図 16

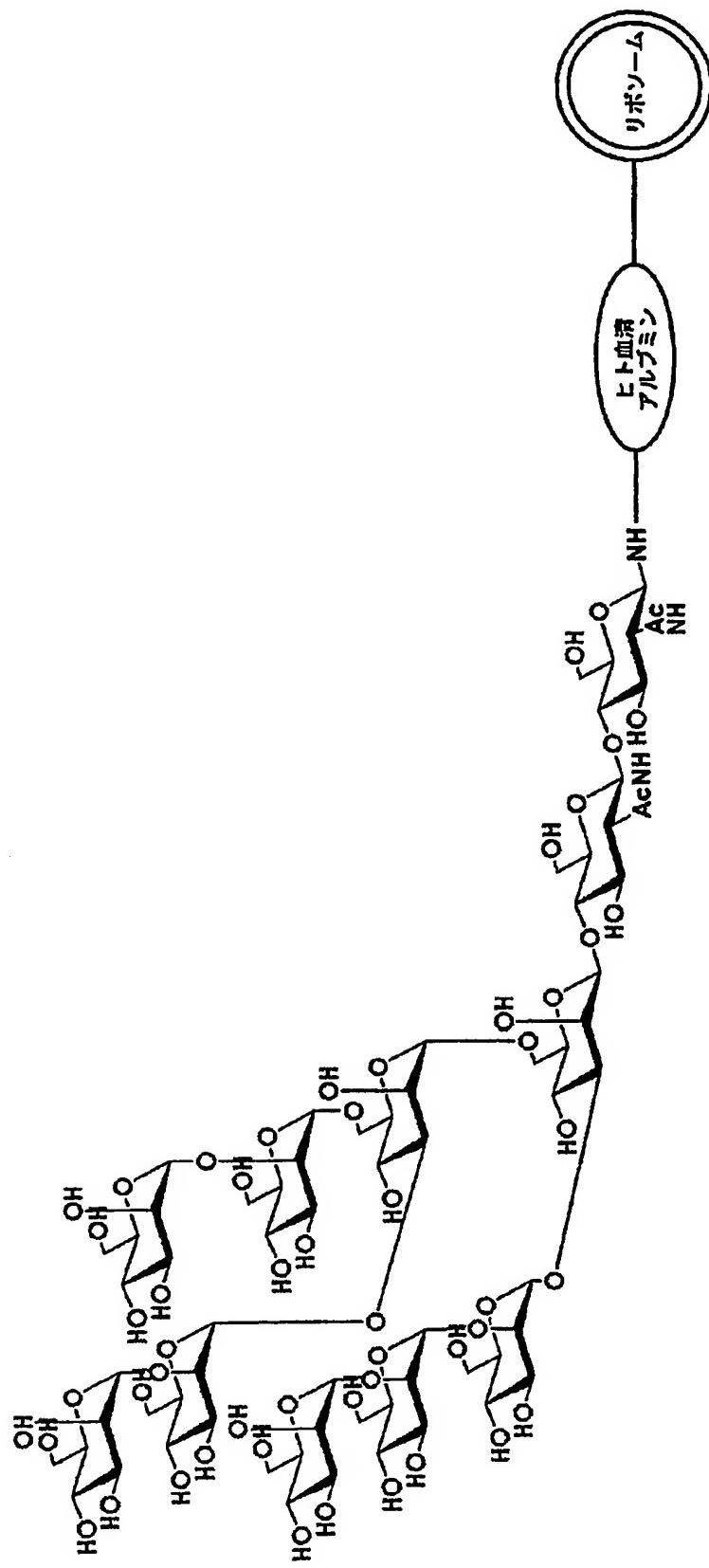




図 17

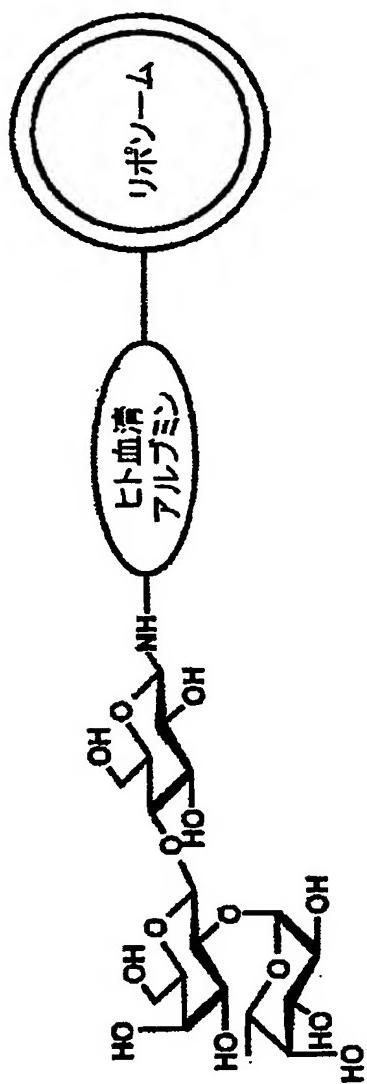


図 18

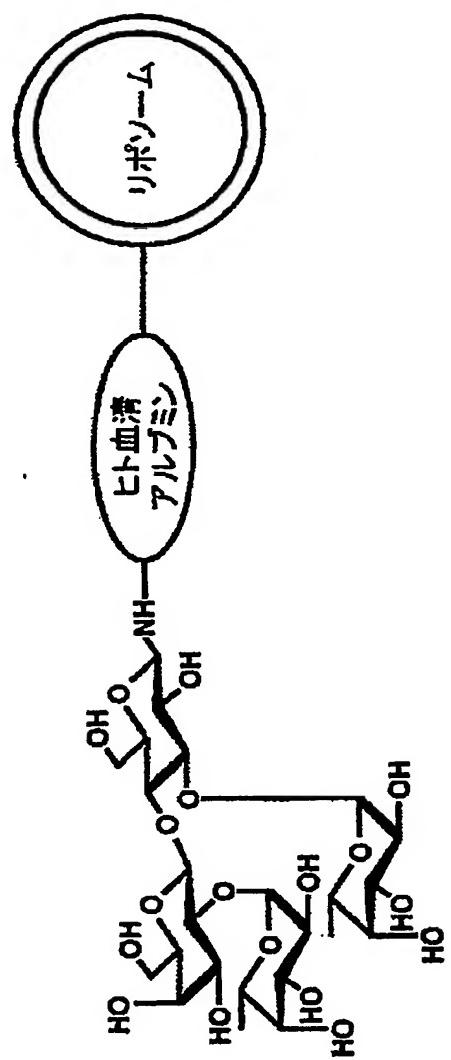


図 19

図 20

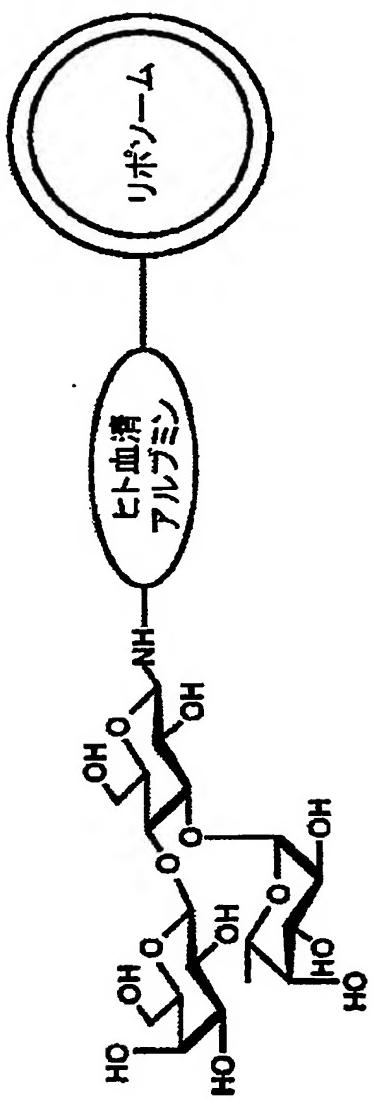


図 21

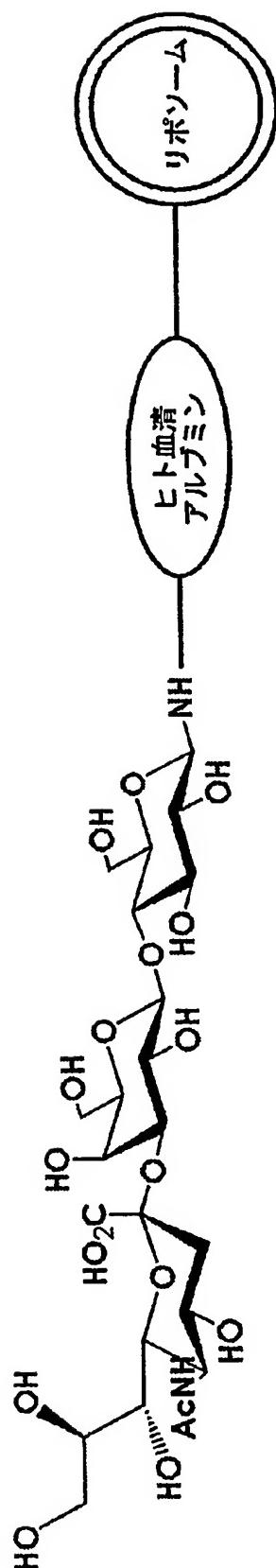


図 22

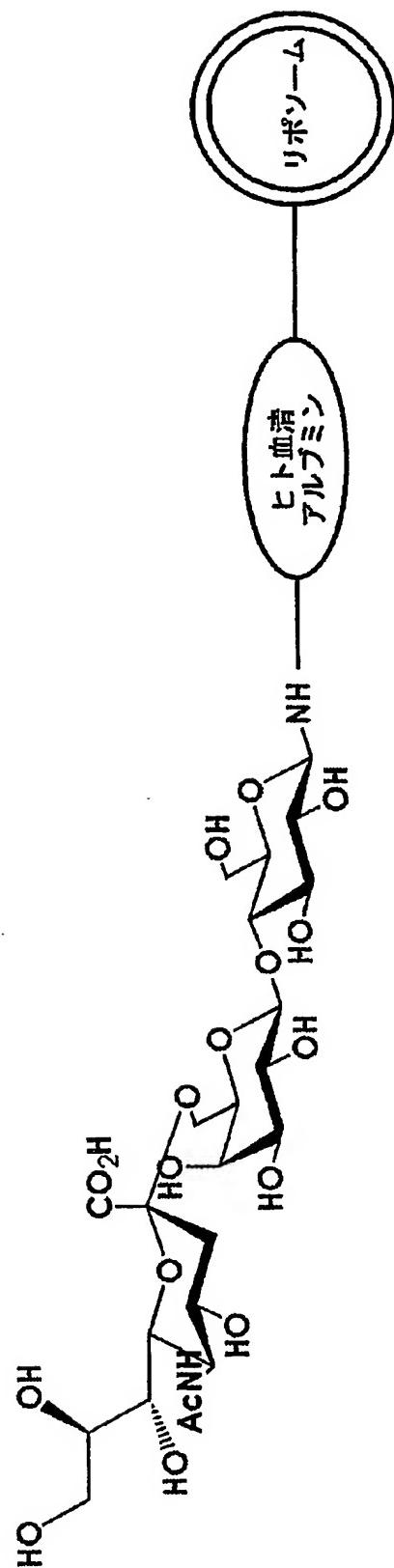


図23

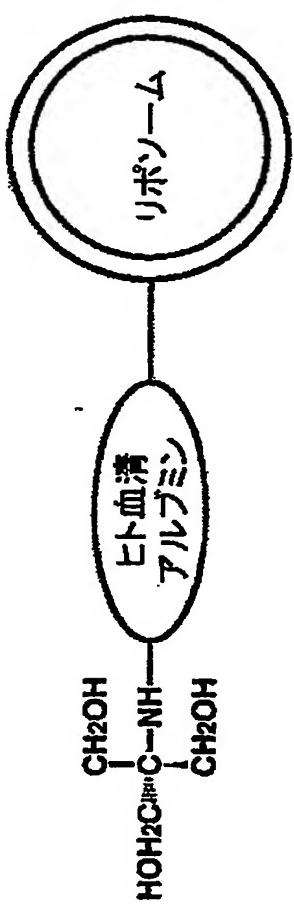




図24

図 2 5 A

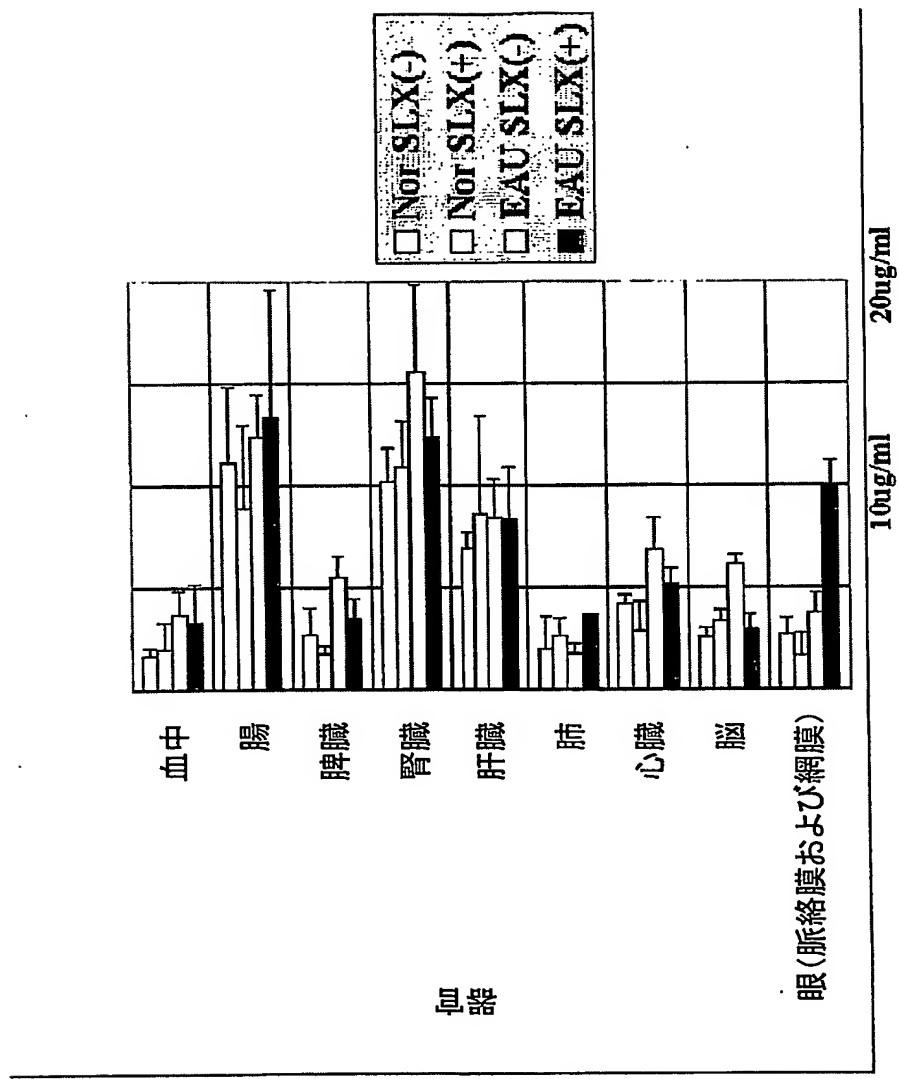


図25B

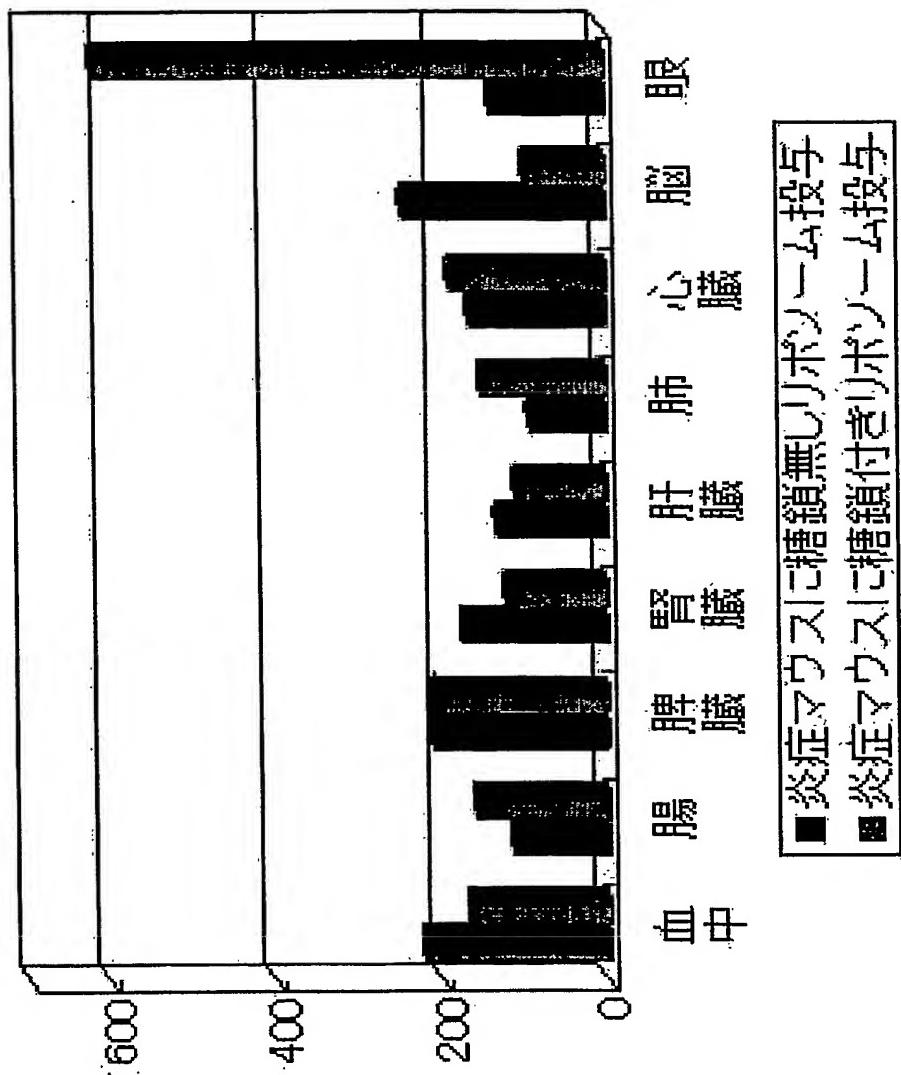


図 26

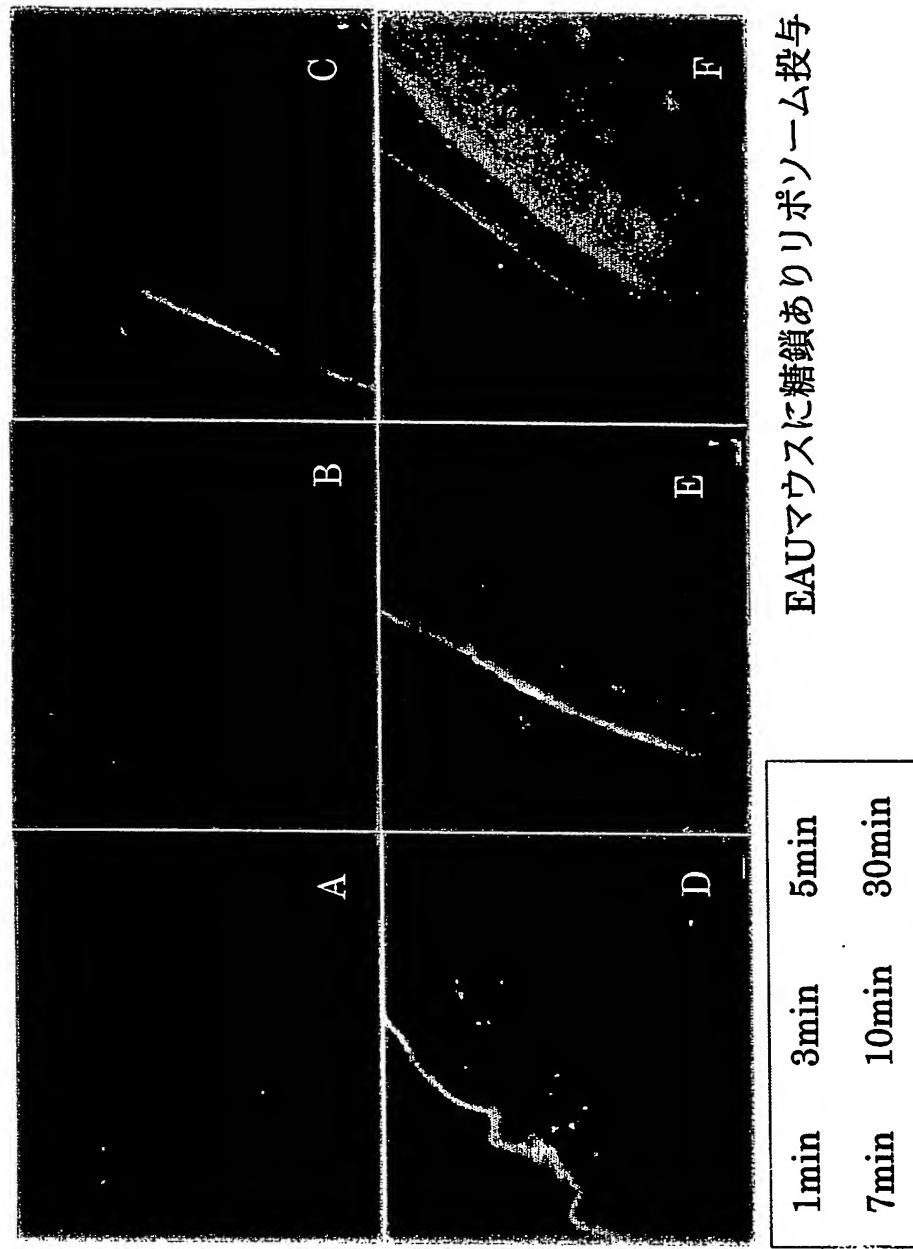
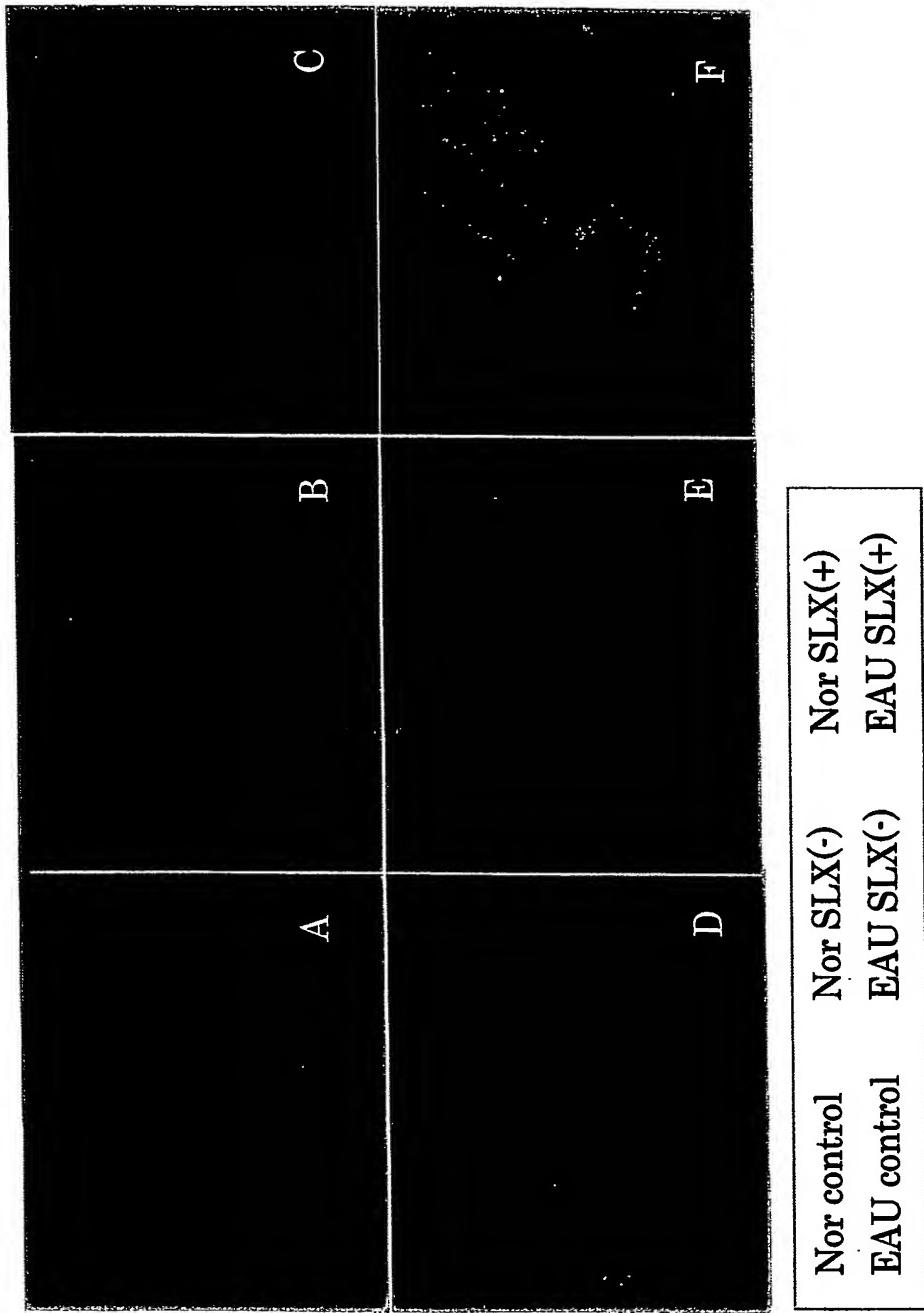
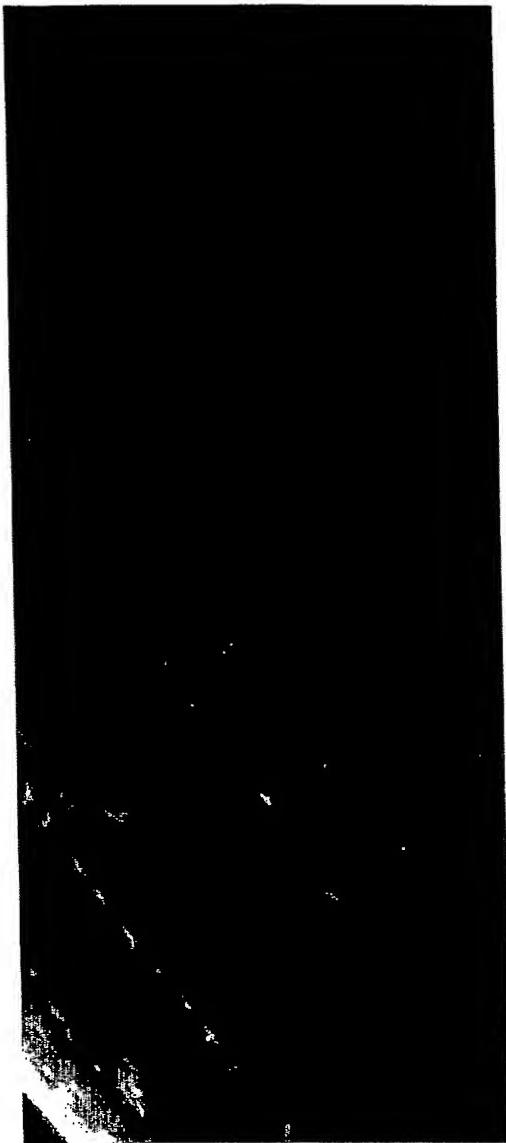


図27





抗E-selectinポリクローナル抗体 プロッキングペプチド

図 28

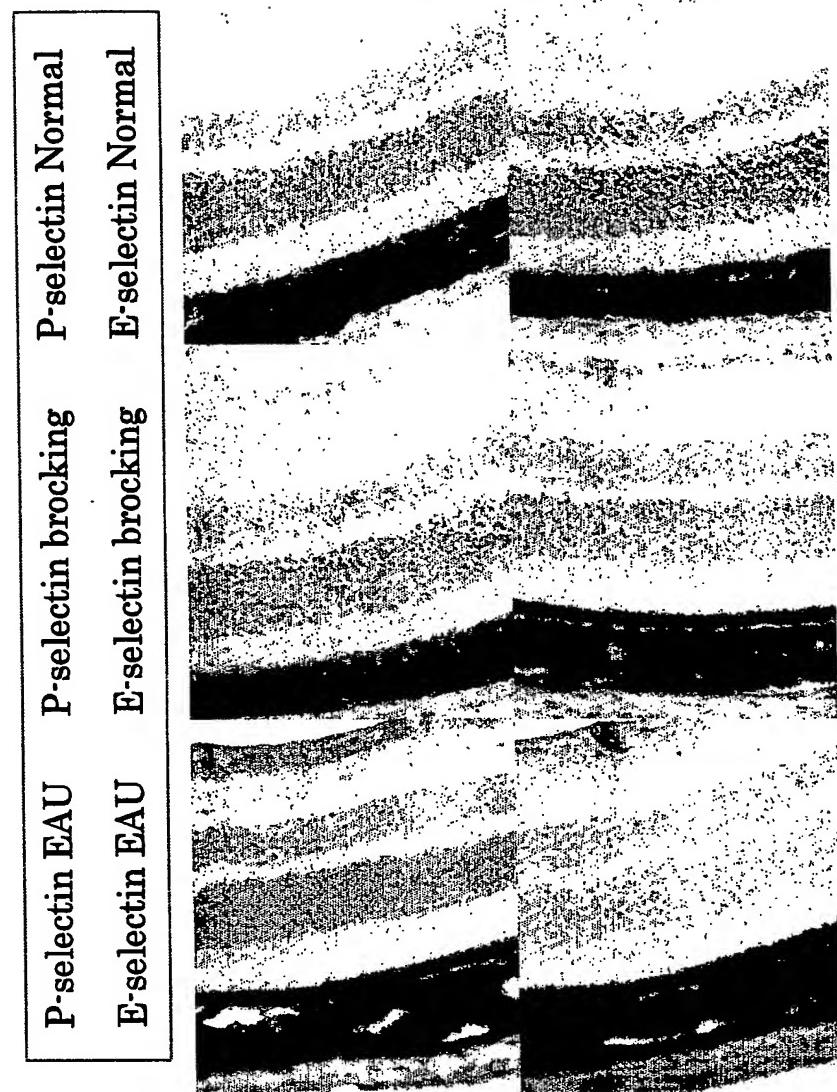
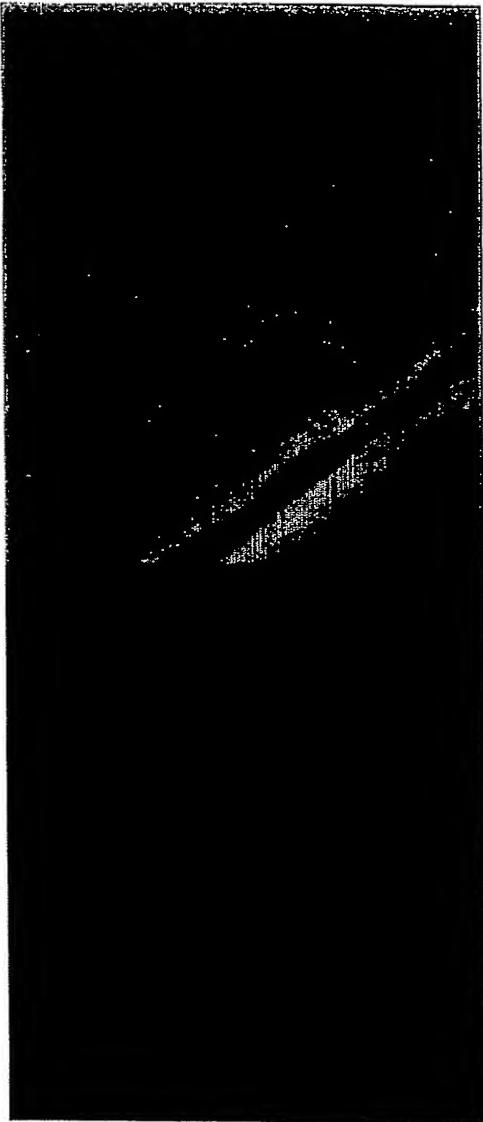


図29

図 30

抗 P-selectin + E-selectin アイソタイプ IgG 投与群
抗体投与群



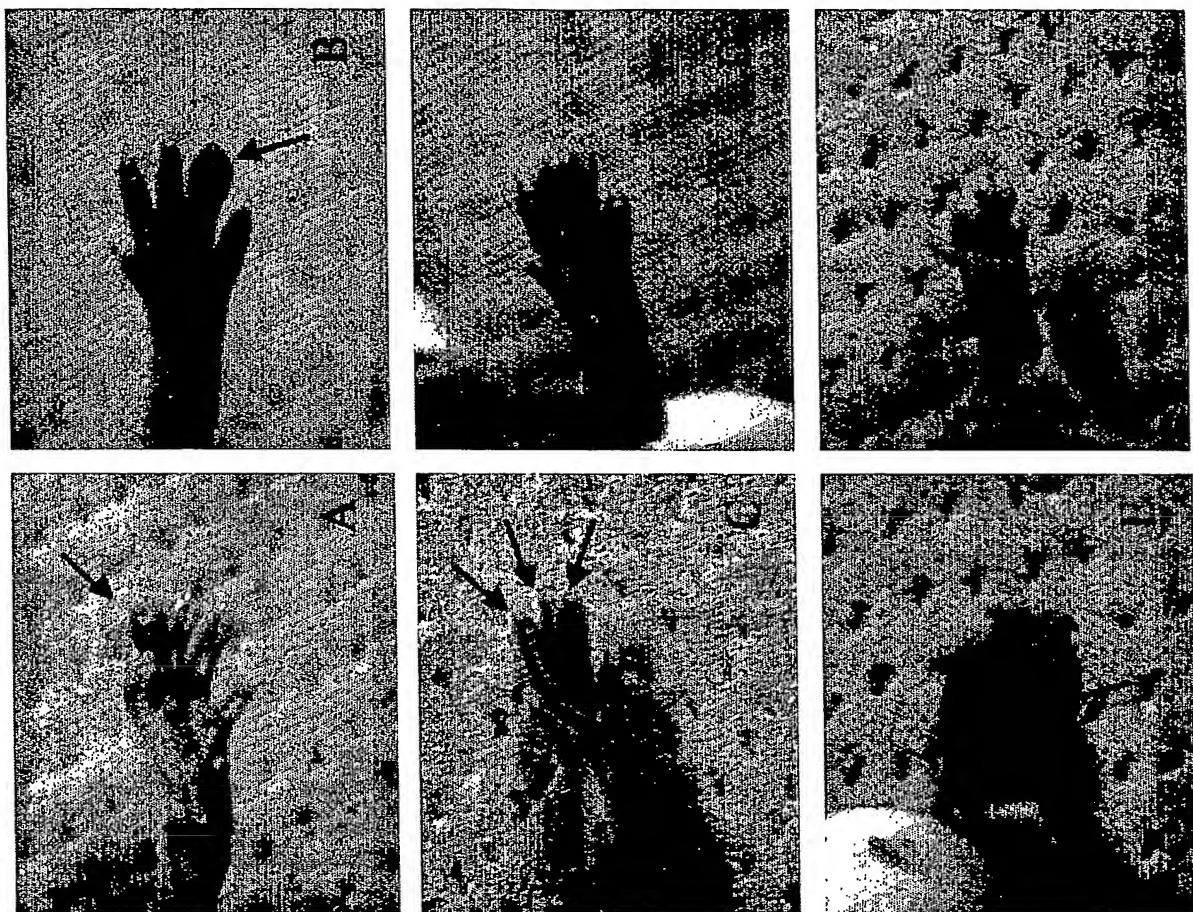


図31

図 3 2

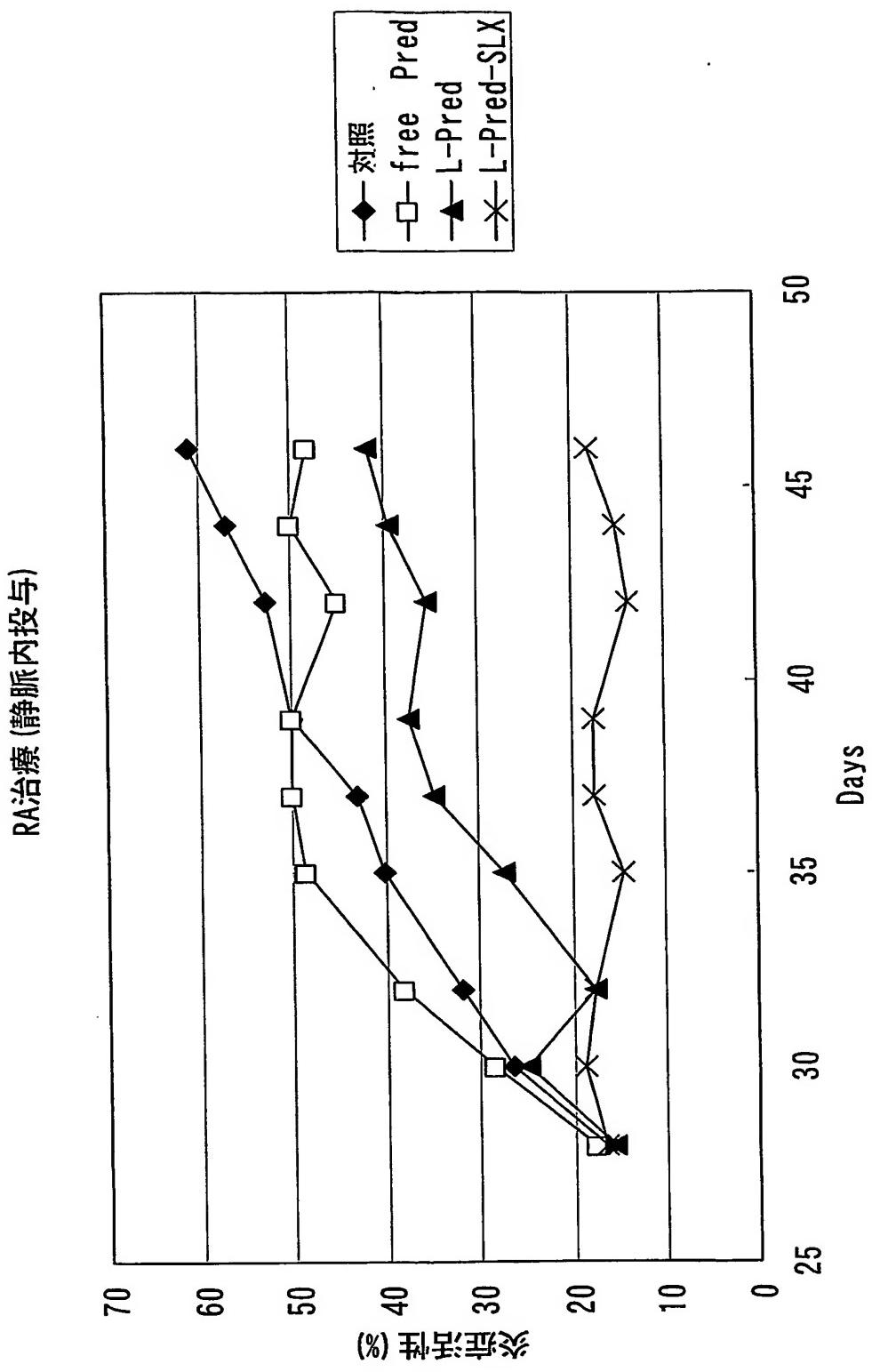


図 3 3

RA治療(経口投与)

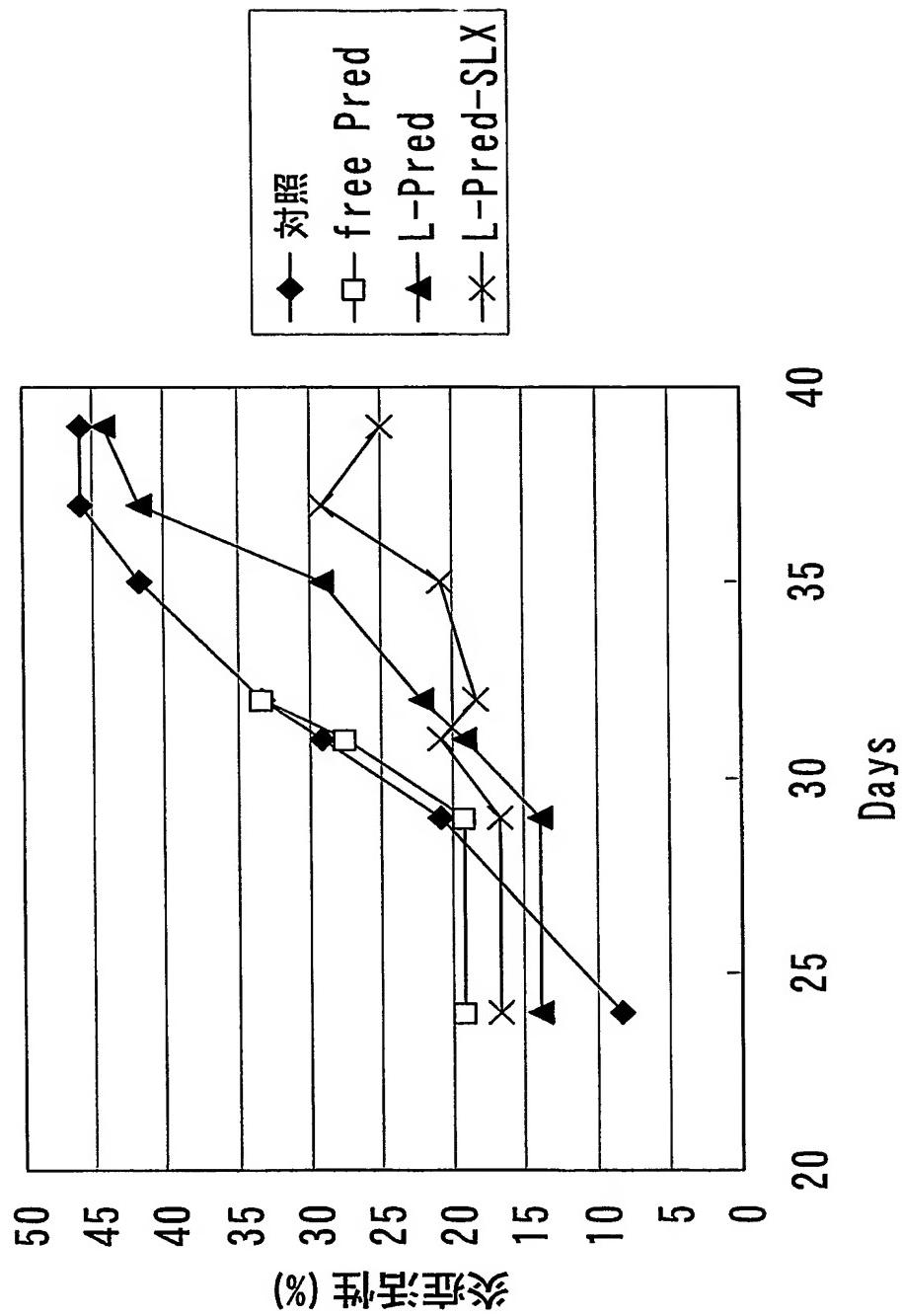
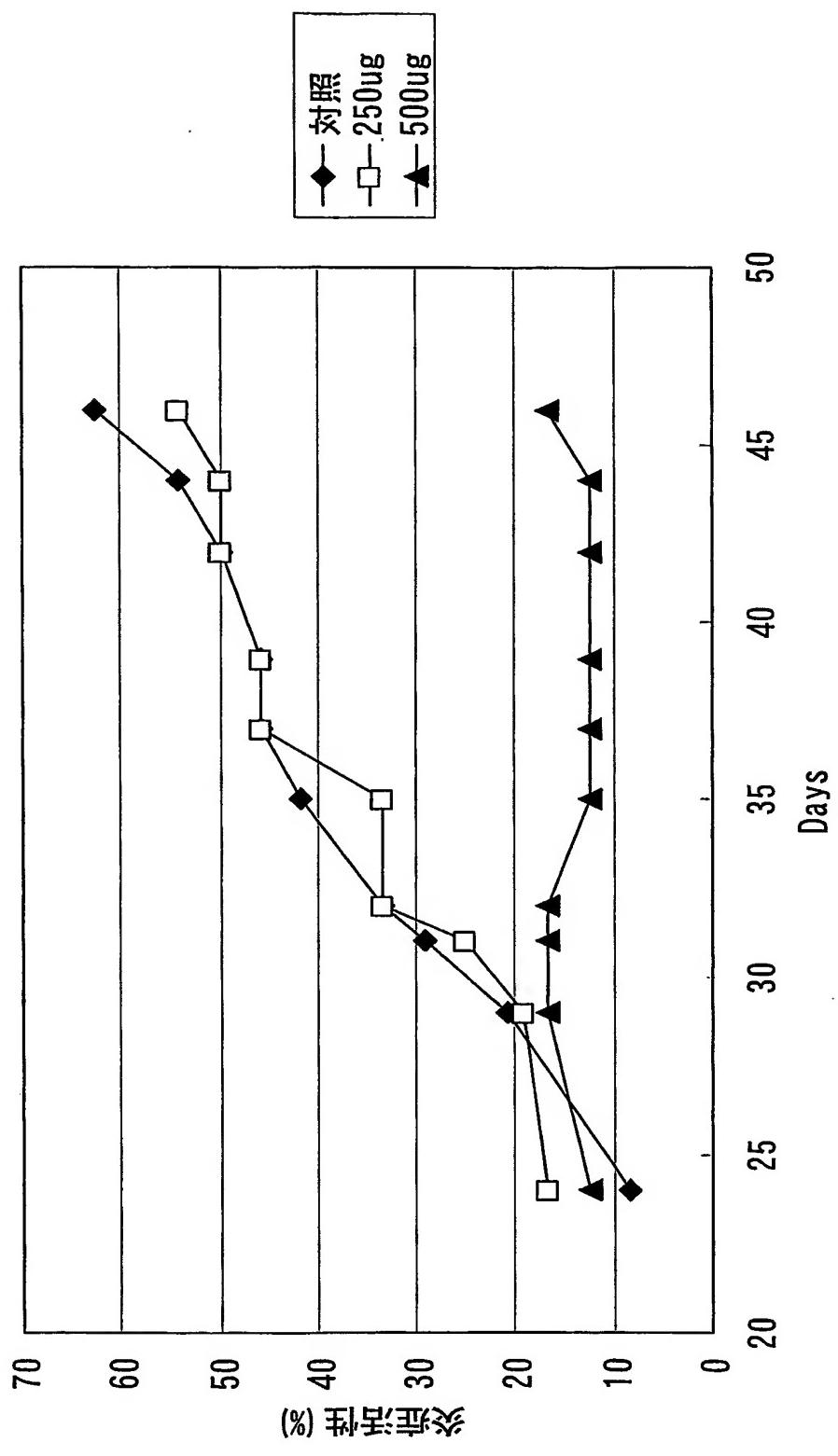


図 34

RA治療(静脈内投与)



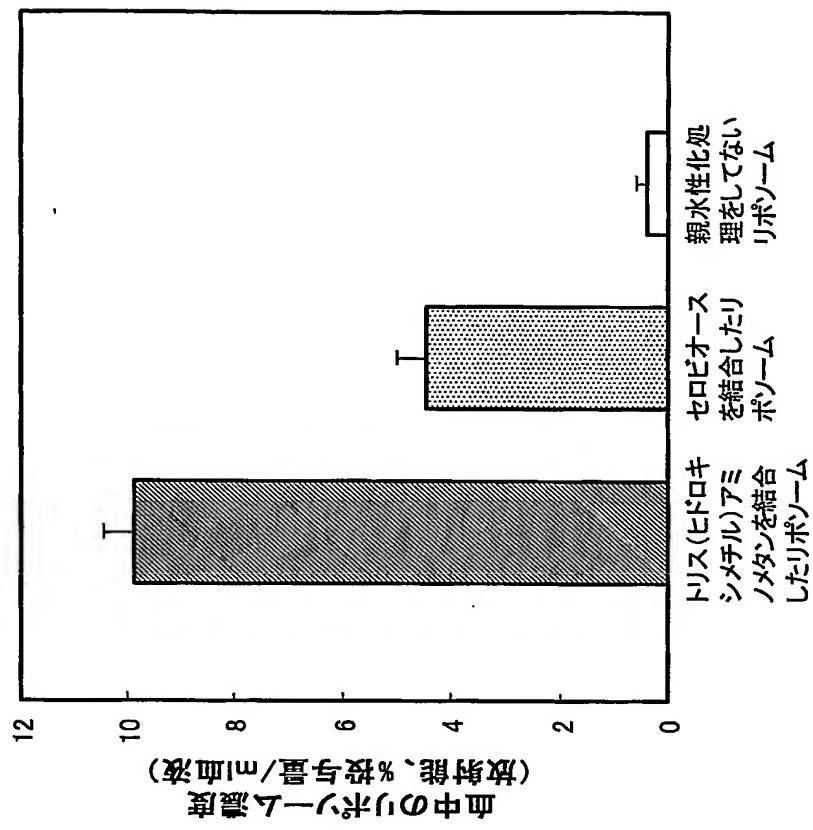


図 35

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/011329

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K9/127, 47/24, 47/26, 47/28, 47/36, 47/42, 49/00, A61P29/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K9/127, 47/24, 47/26, 47/28, 47/36, 47/42, 49/00, A61P29/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2004
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2004 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2004

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), EMBASE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 5-507519 A (Cytel Corp.), 28 October, 1993 (28.10.93), Full text; particularly, Claims 22 to 81 & WO 91/19502 A1	1-9, 27, 29, 30, 32, 33, 35, 36, 41 10-26, 28, 31, 34, 37-40, 42-64
X	WO 02/45688 A2 (YAMANOUCHI EUROPE B.V.), 13 June, 2002 (13.06.02), Full text Particularly, Claims 1 to 10 & JP 2004-517835 A	42, 43, 45, 47, 49, 55-59, 64 1-41, 44, 46, 48, 50-54, 60-63
Y		

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
21 October, 2004 (21.10.04)Date of mailing of the international search report
09 November, 2004 (09.11.04)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/011329

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2003/0143267 A1 (YAMAZAKI, Noboru), 31 July, 2003 (31.07.03), Full text; particularly, Claims 1 to 15; examples 1 to 17 & JP 2003-226638 A & JP 2003-226647 A	1-64

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/011329

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
(See extra sheet.)

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/011329

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

The invention according to claim 1 relating to "a medicinal composition for treating or diagnosing an inflammatory disease containing sugar chain-modified liposomes in which a sugar chain is bonded to liposome membrane" and the invention according to claim 42 relating to "a medicinal composition for treating or diagnosing an inflammatory disease containing liposomes in which liposome membrane is made hydrophilic and no sugar chain is bonded to the surface" are common to each other in "using liposomes in treating inflammation".

However, this constitution has been publicly known as reported in the following document. Thus, there is no relevancy involving any special technical feature between them.

Such being the case, these inventions cannot be considered as a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

Document: JP 5-507519 A (Cytel Corp.), 28 October, 1993 (28.10.93)

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））
Int. Cl' A61K9/127, 47/24, 47/26, 47/28, 47/36, 47/42, 49/00, A61P29/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））
Int. Cl' A61K9/127, 47/24, 47/26, 47/28, 47/36, 47/42, 49/00, A61P29/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2004年
日本国登録実用新案公報	1994-2004年
日本国実用新案登録公報	1996-2004年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAPLUS (STN)	BIOSIS (STN)
REGISTRY (STN)	EMBASE (STN)
MEDLINE (STN)	

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 5-507519 A(サイテル・コーポレイション)1993.10.28, 全文, 特に請求項22-81 & WO 91/19502 A1	1-9, 27, 29, 30, 32, 33, 35, 36, 41
Y		10-26, 28, 31, 34, 37-40, 42- 64

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「I」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

21. 10. 2004

国際調査報告の発送日

09.11.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

小堀 麻子

4C 2938

電話番号 03-3581-1101 内線 3451

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 02/45688 A2(YAMANOUCHI EUROPE B. V.) 2002. 06. 13, 全文, 特に 請求項1-10	42, 43, 45, 47, 49, 55-59, 64
Y	& JP 2004-517835 A	1-41, 44, 46, 48, 50-54, 60- 63
Y	US 2003/0143267 A1(YAMAZAKI, Noboru) 2003. 07. 31, 全文, 特に請 求項1-15, 実施例1-17 & JP 2003-226638 A, JP 2003-226647 A	1-64

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見(第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見(第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

別紙参照

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

第III欄

請求の範囲1に係る発明「糖鎖がリポソーム膜に結合されている糖鎖修飾リポソームを含む炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物」と、請求の範囲42に係る発明「リポソーム膜が親水性化されており、表面に糖鎖が結合していないリポソームを含む炎症性疾患治療用または診断用医薬組成物」は「リポソームを炎症の治療に用いること」において共通している。

しかしながら、下記文献に記載のとおり当該構成は公知であるため、両者の間に特別な技術的特徴を含む関係は認められない。

したがって、両者は単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明とは認められない。

文献：JP 5-507519 A(サイテル・コーポレイション)1993.10.28